

Aus dem Institut für Klinisch - Experimentelle Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Prof. Dr. Michael D. Menger)

# Der Einfluss von körpereigenen und nicht körpereigenen Antioxidantien sowie von antiinflammatorischen Substanzen auf die Mikrozirkulation in kritisch ischämischem Lappengewebe.

Als Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

2010

Vorgelegt von: Annick Bächle

Geboren am 03.03.1983 in St. Ingbert

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Der Einfluss von körpereigenen und nicht körpereigenen Antioxidantien sowie von antiinflammatorischen Substanzen auf die Mikrozirkulation in kritisch ischämischem Lappengewebe. ....	1
<b>2.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>3</b>
2.1	The influence of endogenous and exogenous antioxidants as well as of anti-inflammatory substances on the microcirculation in critically perfused flap tissue .....	3
<b>3.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
3.1	Geschichte der Plastischen Chirurgie und der Lappenchirurgie .....	5
3.2	Ziele plastischer Eingriffe.....	6
3.3	Einteilung von Lappenplastiken .....	6
3.4	Anhaltende Ischämie und endotheliale Dysfunktion.....	8
3.5.	Entstehung von Gewebeschädigung durch oxidativen Stress .....	9
3.5.1	N- Acetylcystein (NAC) .....	10
3.5.2	Vitamin E .....	10
3.6	Stoffwechsel der Hämoxygenase (HO).....	11
3.7	Gewebeentzündung .....	12
3.7.1	Cyclooxygenasen und Prostaglandine .....	13
3.7.1	Inhibitoren der Cyclooxygenasen und Cox-2 Selektivität.....	13
<b>4.</b>	<b>FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>16</b>

<b>5.</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK.....</b>	<b>17</b>
5.1	Versuchstiere .....	17
5.2	Modell .....	17
5.2.1	Anästhesie .....	17
5.2.2	Vorbereitung .....	18
5.2.3	Chemikalien .....	19
5.2.4	Präparation .....	21
5.2.5	Versuchsanordnung .....	24
5.3	Untersuchungsmethoden.....	25
5.3.1	Mikrozirkulation .....	25
5.3.2	Intravitale Mikroskopie .....	38
5.3.3	Mikrozirkulatorische Parameter .....	30
5.4	Datenerfassung und Statistik .....	33
5.4.1	Datenerfassung .....	33
5.4.2	Statistische Bearbeitung .....	33
5.4.3	Graphische Darstellung .....	34
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
6.1	Nicht körpereigene Antioxidantien .....	35
6.2	Körpereigene Antioxidantien .....	47
6.3	Antiinflammatorische Substanzen .....	64
<b>7.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>83</b>
7.1	Diskussion des Modells und der Methoden .....	83
7.2	Diskussion der Ergebnisse .....	85
7.2.1	Nicht körpereigene Antioxidantien .....	85
7.2.2	Körpereigene Antioxidantien .....	91

7.2.3	Antiinflammatorische Substanzen .....	94
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>108</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>109</b>

# 1. Zusammenfassung

Anhaltende Ischämie kann zu Wundheilungsstörungen und Gewebenekrose führen, welche in der Chirurgie, insbesondere aber in der Lappenchirurgie, die Patientenmorbidity erhöhen und das Gesundheitswesen belasten. Ursächlich dafür ist eine Mikrozirkulationsstörung, die zu mangelnder Sauerstoffversorgung, Akkumulation von toxischen Metaboliten und Entzündungszellen sowie einem Anstieg der Zellapoptose führt. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, welchen Einfluss eine Vorbehandlung auf die Mikrozirkulation in kritisch ischämischem Lappengewebe hat.

An C57BL/6 Mäusen in Pentobarbital-Narkose wurde ein lateral gestielter Hautlappen unter Mitnahme des Panniculus carnosus gehoben und in einer chronischen Rückenhautkammer fixiert. Die Analyse der Mikrozirkulation erfolgte mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 nach Lappenhebung, bzw. Induktion der kritischen Ischämie. Nach Verabreichung diverser Fluoreszenzfarbstoffe wurde die Ausdehnung der Gewebenekrose, die Mikrohämodynamik (Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, volumetrischer Blutfluss, funktionelle Kapillardichte), die Inflammation (Leukozyten-Endothelzell-Interaktion), der apoptotische Zelltod und die angiogene Antwort untersucht. Die in Echtzeit erhobenen Daten wurden in der Folge mittels einer speziellen Software (Cap Image<sup>®</sup>) off-line analysiert.

Folgende Substanzen wurden untersucht:

1. körpereigene Antioxidantien: Biliverdin und Hämin
2. nicht körpereigene Antioxidantien: N-Acetylcystein (NAC) und Trolox
3. antientzündliche Substanz: NS 398 (selektiver Cyclooxygenasehemmer)

Im ersten Versuchsabschnitt mit körpereigenen Antioxidantien zeigte sich, dass im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe weder die Vorbehandlung mit Biliverdin noch mit Hämin eine entscheidende Vasodilatation und somit eine Erhöhung des Blutflusses in dem untersuchten Gewebe hervorruft. Die Verabreichung von Biliverdin induzierte sogar einen nahezu vollständigen Verlust der nutritiven Perfusion und damit eine deutliche Verschlechterung des Lappenüberlebens gegenüber der Kontrollgruppe.

Im zweiten Versuchsabschnitt mit nicht körpereigenen Antioxidantien konnte man feststellen, dass das antioxidative Potenzial der beiden verabreichten Substanzen ausreichend war, um die Entzündungsantwort zu reduzieren und den Ischämie-induzierten apoptotischen Zelltod weitestgehend zu verhindern. Um die Lappennekrose zu reduzieren bedurfte es zusätzlich einer ausgeprägten dilatatorischen Antwort in Arteriolen, die im Gegensatz zu unbehandelten Tieren bzw. mit Trolox vorbehandelten Tieren nur in denjenigen Tieren beobachtet werden konnte, denen NAC verabreicht wurde. Daraus ergab sich eine Erhöhung des arteriolen Blutflusses und eine Aufrechterhaltung der funktionellen Kapillardichte.

Die im letzten Versuchsabschnitt durchgeführten Untersuchungen mit dem selektiven Cox-2-Hemmer ergaben, dass auch die Verabreichung dieser Substanz im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer signifikant reduzierten Entzündungsantwort und einer Verminderung des apoptotischen Zelltodes einhergeht. Dies reichte jedoch nicht aus, um das Lappenüberleben zu verbessern, obwohl die nutritive Kapillarperfusion aufrechterhalten werden konnte. Neoangiogenese konnte in keinem der behandelten Tiere nachgewiesen werden.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die pharmakologische Vorbehandlung bzw. Behandlung von muskulokutanem Gewebe, d.h. Behandlung vor und nach Induktion anhaltender Ischämie, mit nicht körpereigenen Antioxidantien und der antinflammatorischen Substanz NS 398 die initiale Entzündungsreaktion und den apoptotischen Zelltod signifikant vermindern und auf diese Weise die nutritive Perfusion verbessern bzw. aufrechterhalten kann. Dies ist jedoch nicht ausreichend um das Lappenüberleben zu verbessern. Ein signifikant verbessertes Lappenüberleben beobachteten wir nur in NAC vorbehandelten Tieren durch die Vermittlung einer ausgeprägten arteriolen Dilatation und somit einer Erhöhung des Blutflusses und einer Aufrechterhaltung der Kapillarperfusion. NAC stellt somit eine einfache, nicht invasive und kostengünstige Behandlungsstrategie für den Einsatz im klinischen Alltag dar. Biliverdin und Hämin sollten aufgrund des negativen Einflusses auf die Mikrozirkulation im Lappengewebe nicht eingesetzt werden.

## 2. Summary

Sustained ischemia may lead to wound breakdown and tissue necrosis. In surgery, especially in flap surgery, these complications come along with increased morbidity of patients which strains the health care system. The cause for this is an inadequate microcirculatory blood supply which leads to insufficient oxygen supply, accumulation of toxic metabolites and inflammatory cells and to an increase in apoptotic cell death. The aim of this study was to elucidate the influence of different pretreatment strategies on the microcirculation in critically perfused musculocutaneous flaps.

Pentobarbital-anesthetized C57BL/6 mice were used for dorsal skinfold chamber preparation containing a random pattern musculocutaneous flap. The flap consisted of skin and panniculus carnosus. Analyses of the microcirculation were performed by means of repetitive intravital epifluorescence microscopy at day 1, 3, 5, 7 and 10 after flap elevation, i.e. induction of ischemia. After application of distinct fluorescent dyes the area of necrosis, different parameters of the microcirculation (blood vessel diameters, red blood cell velocity, volumetric blood flow, capillary density), the inflammatory response (interaction between leukocytes and endothelial cells), apoptotic cell death and angiogenic response were studied. All parameters were analyzed offline, using a computer-assisted analysis system (Cap-Image®).

The following substances were analyzed:

1. endogenous antioxidants: biliverdin and hemin
2. exogenous antioxidants: N-acetylcystein and trolox
3. the anti-inflammatory NS 398 (a selective inhibitor of the cyclooxygenase)

The first part of the study demonstrated that neither the pretreatment with biliverdin nor with hemin induces significant vasodilation and, therefore, an augmented blood flow of the tissue analyzed. The application of biliverdin even induced a complete loss of nutritive perfusion and, thus, a distinct decline of flap survival when compared to controls.

The second part of the study showed that the antioxidative capacity of NAC and trolox was capable of reducing the inflammatory response and preventing ischemia-induced apoptotic cell death. However, a distinct arteriolar vasodilation was required to reduce flap necrosis, which was only seen in NAC-treated animals. In these animals, we could also



detect an increased arteriolar blood flow and a maintained functional capillary density.

NS 398, a selective cyclooxygenase-inhibitor, showed - when compared to controls - a significantly reduced inflammatory response and a decreased apoptotic cell death. However this was not sufficient to increase flap survival, although the nutritive perfusion could be maintained. None of the applied substances could provoke neoangiogenesis.

The present study shows that pharmacological pretreatment of critically ischemic musculocutaneous tissues with exogenous antioxidants and the anti-inflammatory Cox-inhibitor NS 398 reduces the initial inflammatory response and the apoptotic cell death, thereby protecting nutritive perfusion. This, however, was not always adequate to prevent flap necrosis. Only N-acetylcystein provoked an increase of flap survival, most probably due to arteriolar dilation, enhancement of arteriolar blood flow and maintenance of nutritive perfusion. Therefore, NAC may represent a simple, non invasive and cost-effective pretreatment strategy to improve survival of critically ischemic flaps.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Geschichte der Plastischen Chirurgie und der Lappenchirurgie

In den letzten 40 bis 50 Jahren hat die Medizin im Allgemeinen und die plastische Chirurgie im Speziellen eine sehr fortschrittliche Entwicklung durchlaufen. Dank dieser Entwicklung werden in der heutigen Zeit Krankheiten, Verletzungen oder Fehlbildungen erfolgreich behandelt. Konsequenz dieser oft komplizierten chirurgischen Eingriffe können dicke, hypertrophe Narben, Verstümmelungen, Fehlbildungen und v.a. ischämiebedingte Wundheilungsstörungen oder gar Gewebeverluste sein, welche für den Patienten nicht nur ein gesundheitliches sondern auch ein psychosoziales oder aber sozioökonomisches Problem darstellen. Der schon 1978 von P.J. Desault geprägte Begriff „plastique“, rückte daher als Teilgebiet der Chirurgie immer mehr in den Vordergrund und wurde 1993 – um der zunehmenden Bedeutung der plastischen Chirurgie Ausdruck zu verleihen – von der deutschen Ärztekammer als eigenständiges Fach anerkannt.

Die Geschichte der plastischen Chirurgie ist eng verknüpft mit der Geschichte der Lappenchirurgie. Die älteste dokumentierte Lappentechnik ist die indische Nasenersatzplastik, die aus dem 6. Jahrhundert vor Christus stammt. Hier wurde die abgeschnittene Nase von Ehebrechern mit einem Hautlappen der Stirn rekonstruiert. Eine Abwandlung dieser Technik etablierte im 16. Jhd. Gasparo Tagliacozzi, der beispielsweise syphilitisch verstümmelte Nasen mit gestielten Oberarmlappen (Distanzlappen) rekonstruierte. In den letzten zweieinhalbtausend Jahren wurden für Rekonstruktionen entweder Hauttransplantate oder gestielte Lappen mit je nach Defekt zufälliger Form und Durchblutung (random pattern flap) verwendet. Erst nach Carl Manchots Veröffentlichungen über die Anatomie der Hautarterien des menschlichen Körpers (1889) und dem besseren Verständnis der Durchblutung in Haut und Muskel erfuhr die Lappenchirurgie eine Renaissance. So wurden nach und nach mehrere neue Lappen beschrieben, wie z.B. der Insellappen im Gesichtsbereich (J.F. Esser 1918-1934), der medial gestielte axiale Pektoralislappen (J. Joseph, 1931), der neurovaskuläre gestielte Transpositions-lappen am Finger (Littler, 1954) sowie ein neurovaskulärer Insellappen zur Resensibilisierung des Daumens (E. Moberg, 1954). Mit dem Beginn des mikrochirurgischen Zeitalters Mitte des 20. Jahrhunderts gelang nach und nach auch die Transposition von freien Lappen, d.h. der Gewebetransfer beruhend auf einer mikrovaskulären Anastomosierung von Lappenarterie

und Vene sowie Empfängerarterie und Vene. Des Weiteren gibt es eine Vielzahl an Lappen, die ohne definiertes Gefäßbündel einen umliegenden Gewebedefekt decken können. Diese Lappen haben unabhängig von deren Typ (gestielt-frei, definierter Gefäßstiel oder randomisierte Durchblutung) eine Gemeinsamkeit: sie sind der Ischämie und Reoxygenierung und deren Folgen ausgesetzt. Entsprechend sind kritisch perfundierte Lappen und Lappenareale, insbesondere wenn die Ischämie anhält, von Zelltod bzw. Gewebeuntergang bedroht. Je nach Ausmaß führt dies zu Wunddehiszenz bis hin zu Lappennekrose.

Dank der intensiven Forschung ergaben sich in den letzten Jahren jedoch große Fortschritte auf dem Gebiet der Lappenchirurgie.

### **3.2. Ziele plastischer Eingriffe**

Schmidt Tintemann formulierte 1970: „Die plastische Chirurgie hat als Ziel die Wiederherstellung von gestörter äußerer Form und Funktion, um damit eine Verbesserung der subjektiven Situation zu erreichen“. Dabei sind einige Regeln besonders zu beachten: Das wichtigste Ziel plastischer Eingriffe ist es, die Funktion des betroffenen Gebietes wiederherzustellen. Ein weiteres Ziel plastischer Chirurgie ist es, die Ästhetik des betroffenen Bereiches zu wahren bzw. wiederherzustellen. Dies gilt insbesondere im Gesichtsbereich. Zuletzt muss beachtet werden, dass der plastisch-chirurgische Eingriff den Patienten bezüglich Funktion und Ästhetik des betroffenen Gebietes nicht stärker beeinträchtigt als der ursprüngliche Defekt. Es müssen also verschiedene Behandlungsmöglichkeiten sowie mögliche Ergebnisse und Komplikationen gegeneinander abgewogen werden.

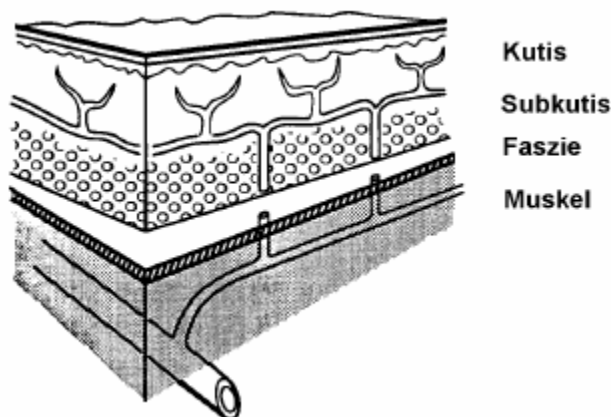
### **3.3 Einteilung von Lappenplastiken**

Lappenplastiken werden dann angewendet, wenn ein Gewebedefekt so groß ist, dass weder ein primärer, lokaler Verschluss des Defektes noch eine Deckung durch nicht vaskularisierte Haut (Hauttransplantat) möglich sind, das Empfängerareal nicht genügend vaskularisiert ist (fehlendes Granulationsgewebe) oder aber die Ausgangsbedingungen mit der Ästhetik des Betroffenen nicht vereinbar sind [Salmi 2005].

Je nach Durchblutung werden 2 Arten von Lappen unterschieden:

1. Willkürlich durchblutete Lappen (random pattern flap):

Die Durchblutung des „random pattern flap“ erfolgt zufällig, d.h. es existiert kein definiertes Blutgefäß, das die Perfusion des Lappens sichert. Die Durchblutung erfolgt stattdessen über Gefäße, die im breiten Lappenstiel angeordnet sind, hauptsächlich über den subkoralen Gefäßplexus (s. Abb. 3.1). Aufgrund dieser Tatsache darf der willkürlich durchblutete Lappen nur nach bestimmten geometrischen Regeln gehoben werden, um ein möglichst sicheres Lappenüberleben zu garantieren. Der Stiel des Lappens kann maximal 5 mal so lang sein wie die Basis breit ist (Gesicht). Je nach Region kann dieses Längen-Breiten- Verhältnis variiert werden (1:1 untere Extremität), wobei in der Regel ein Stiel-Basis-Verhältnis von 2:1 als optimal angesehen wird [Bohmert and Baumeister 1975].



**Abb. 3.1** Versorgung des „random pattern flap“

*Die Perfusion des „random pattern flap“ erfolgt nicht über ein definiertes Gefäß, sondern willkürlich aus dem zugrunde liegenden Kapillarnetz. Die Hebung muss daher geometrischen Gesetzen folgen [Holle J. Plastische Chirurgie. Stuttgart: Hippocrates Verlag; 1994].*

2. Axial gestielte Lappen (axial pattern flap):

Die Perfusion der „axial pattern flaps“ ist von den zugeordneten Gefäßen im Gefäßstiel gesichert. Sie sind also nicht den geometrischen Regeln des „random pattern flap“ unterlegen und können so wesentlich großzügiger gestaltet werden. Hierbei müssen allerdings die Angiosome berücksichtigt werden (Angiosome = Hautareal, welches von einem Gefäß perfundiert wird), d.h. die Begrenzung muss in der Anatomie liegen, die aber nicht zwangsläufig mit der makroskopischen Gefäßversorgung übereinstimmen muss, da

Gebiete zwischen zwei Versorgungsbereichen von zwei Gefäßen überlappend perfundiert werden [McGregor and Morgan 1973]. Wird der axial gestielte Hautlappen ohne Rücksicht auf das Angiosom oder überdimensioniert geplant, kann es sein, dass der Gefäßstiel nicht ausreichend über randomisierte Lappenareale perfundiert wird.

### **3.4. Anhaltende Ischämie und endotheliale Dysfunktion**

Unter „Ischämie“ versteht man eine pathologisch verminderte oder aufgehobene Durchblutung eines Gewebes infolge mangelnder arterieller Zufuhr von Blut. Man unterscheidet dabei zwischen einer relativen Ischämie, bei der ein unzureichender Blutfluss im Vergleich zum Bedarf nachweisbar ist und einer absoluten Ischämie, die durch das komplette Fehlen einer arteriellen Durchblutung gekennzeichnet ist.

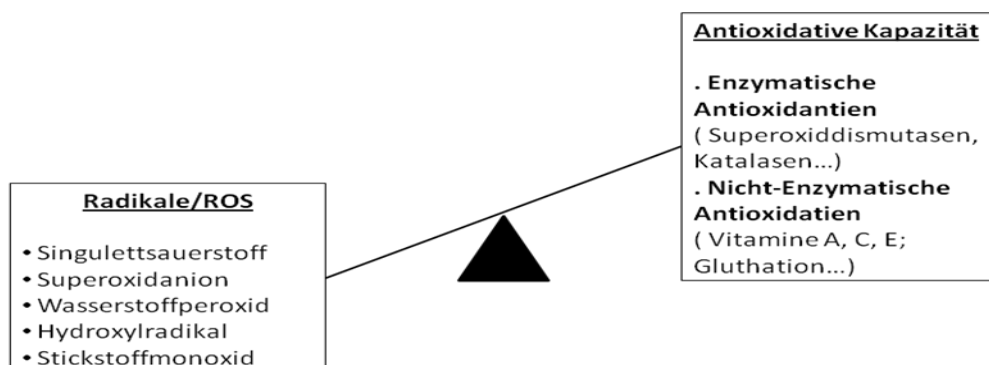
Bei der Präparation eines willkürlich durchbluteten „random pattern flap“ wird durch die Abtrennung der seitlich zuführenden Blutgefäße eine relative Ischämie, besonders im distalen Areal des Lappens, ausgelöst. Ursache dafür ist die Tatsache, dass die Perfusion nur noch durch die von basal zuführenden Gefäße gewährleistet wird. Kommt es zu einer anhaltenden Ischämie, die die kritische Ischämietoleranz des entsprechenden Gewebes überschreitet, führt dies zu hypoxischen Gewebeschäden, die letztendlich eine Gewebenekrose und damit den partiellen oder sogar vollständigen Lappenverlust bedingen können [Harder, Amon et al. 2004]. Einige Ischämieschäden werden durch eine eventuelle spätere Reperfusion des entsprechenden Gewebeabschnittes wieder aufgehoben oder aber sogar noch verschlimmert. Dies kann zwar ein Phänomen sein, welches auch bei der Präparation von gestielten Lappenplastiken auftritt, ist aber im Wesentlichen ein Problem, das beim freien Lappentransfer verstärkt in Erscheinung tritt.

Die durch die Ischämie bedingte Hypoxie verursacht in den betroffenen Geweben eine Änderung des Zellstoffwechsels. Die Energiebereitstellung erfolgt nicht mehr über die aerobe sondern über die anaerobe Glykolyse, die wesentlich ineffizienter arbeitet. Dies führt zu einer Abnahme der energiereichen Substrate, während sich saure Metabolite aufgrund mangelnder Entsorgung ansammeln, so dass eine intrazelluläre Azidose entsteht. Diese bewirkt zunächst eine Beeinträchtigung zellulärer Funktionen und schließlich über die Schädigung von Membranstrukturen einen partiellen oder kompletten Funktionsverlust der Zelle. Durch die nur mangelhafte Energieausbeute aus der anaeroben Glykolyse sind energiereiche Substrate schnell aufgebraucht und die Na/K-ATPase versagt [Silver 1977]. Da so das Membranpotential nicht mehr aufrechterhalten werden kann, kommt es entlang des osmotischen Gradienten zum Einstrom von Natrium und Chloridionen in die Zelle,

welche freies Wasser nach sich ziehen. Folge dieser Flüssigkeitsverschiebung nach intravasal ist die Entstehung einer Endothelzellschwellung [Menger, Sack et al. 1989; Menger and Lehr 1993], eines intrazellulären Ödems [Leaf 1973] und einer intravaskulären Hämokonzentration [Menger and Lehr 1993]. Eine gelegentlich auftretende Wiederherstellung der Durchblutung ischämischen Gewebes kann den Stoffwechsel der Zelle wieder in den ursprünglichen Zustand zurückversetzen. In manchen Fällen führt diese sogenannte Reperfusion jedoch auch zu einer noch stärkeren Schädigung des betroffenen Gewebes („reflow paradox“) [Menger, Pelikan et al. 1992]. In anderen Fällen hat die Ischämie das Gewebe und die Mikrozirkulation schon so stark beeinträchtigt, dass eine Reperfusion gar nicht mehr stattfinden kann („no reflow“) [Ames, Wright et al. 1968].

### 3.5. Entstehung von Gewebeschädigung durch oxidativen Stress

Anhaltende Ischämie führt nicht nur zu Gewebeschädigung durch endotheliale Dysfunktion, sondern auch zur Entstehung von oxidativem Stress durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dies kann unter Umständen zum partiellen oder sogar vollständigen Lappenverlust führen. Im Körper herrscht unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Radikalen wie dem Singulett-Sauerstoff, Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid etc. und einer antioxidativen Kapazität wie z.B. den enzymatischen Antioxidantien (Superoxiddismutasen und Katalasen) oder nicht-enzymatischen Antioxidantien (Vitamin A, C, E, Glutathion). Wird dieses Gleichgewicht in Anwesenheit von Hypoxie zu Gunsten der Oxidantien verschoben, entsteht oxidativer Stress [Floyd 1999] (s. Abb. 3.2).



## Oxidativer Stress

*Abb. 3.2 Die Entstehung von Oxidativem Stress [Floyd 1999].*

Oxidativer Stress ist eng assoziiert mit Gewebeentzündung. Im Rahmen der durch Hypoxie ausgelösten Gewebeentzündung werden Makrophagen und polymorphkernige Granulozyten aktiviert, die ihrerseits Radikale und auch Entzündungsmediatoren wie Proteasen, Leukotriene und Prostaglandine freisetzen [Ghezzi, Gervasio et al. 1992]. Das Zusammenwirken von Radikalen und Entzündungsmediatoren steigert die Toxizität der ROS und schädigt so die Proteine der Zellmembran, was zu Zelltod (Apoptose) und schließlich zum Absterben des Lappens (Nekrose) führt.

Radikalfänger wie das Antioxidans N-Acetylcystein und das Vitamin-E-Analogon Trolox sind in der Lage, die reaktiven Sauerstoffspezies zu neutralisieren und damit die Gewebeschädigung zu mindern.

### **3.5.1 N-Acetylcystein (NAC)**

NAC zeigt direkte und indirekte antioxidative Eigenschaften. NAC besitzt eine freie Thiol-Gruppe, die in der Lage ist, mit den elektrophilen Gruppen der reaktiven Sauerstoffspezies zu reagieren [Moldeus, Cotgreave et al. 1986; Aruoma, Halliwell et al. 1989]. Es wird so vorübergehend NAC-Thiol gebildet, dessen Hauptendprodukt NAC-Disulfid ist [Cotgreave 1997]. Zusätzlich weist NAC einen indirekten antioxidativen Effekt auf, indem es als Vorläufer des Antioxidans Glutathion wirkt. Glutathion setzt sich zusammen aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Abwehr interner und externer toxischer Faktoren, wie z.B. Stickstoffoxid (NO), Zigarettenrauch und andere Einflüsse, die oxidativen Stress verursachen. Die Sulphydrylgruppe des L-Cystein neutralisiert diese Agentien [Dekhuijzen 2004]. Glutathion wird in Leber und Lunge gebildet. Während Glutaminsäure und Glycin im Körper ausreichend vorhanden sind, reichen die Cysteinreserven im Körper in Situationen stärkeren Bedarfs (oxidativer Stress) nicht aus und es kommt zum Cysteinmangel. Um diesen Mangel auszugleichen, muss Cystein extern verabreicht werden. L-Cystein selbst kann nicht direkt verabreicht werden, da es nicht wasserlöslich und schlecht absorbierbar ist und zu schnell hepatisch metabolisiert wird. NAC hingegen besitzt ebenfalls eine Sulphydrylgruppe und kann leicht in Zellen diffundieren, so dass nach intrazellulärer Umwandlung zu L-Cystein der Mangel ausgeglichen werden kann [Moldeus, Cotgreave et al. 1986].

### 3.5.2 Vitamin E: Ein Vitamin mit antioxidativer Wirkung

Man geht davon aus, dass der Gewebeschaden, der in Situationen oxidativen Stresses durch freie Radikale entsteht, unter anderem auf die verstärkte Aktivierung der Lipidperoxidation in zellulären Membranen zurückzuführen ist [Meerson, Kagan et al. 1982]. Die Lipidperoxidation ist eine physiologisch unerwünschte Reaktion, die durch den Abbau der Fettsäuren, die Destabilisierung der Zellmembranen und damit den Zelltod bewirkt. Sauerstoff spielt in dieser Reaktionskaskade eine wichtige Rolle. Reagiert ein Radikal mit einer ungesättigten Fettsäure, entsteht ein Lipidradikal, welches weitere Fettsäuren angreift. Durch die Anwesenheit von Sauerstoff wird dieser Prozess aufrechterhalten. Radikalfänger wie z.B. Vitamin-E können die Reaktion zwischen zwei Radikalen und damit den Prozess der Lipidperoxidation unterbrechen [Jones, Carlton et al. 1993].

Vitamin-E (Tocopherol) existiert in 3 Redoxstufen, d.h. man unterscheidet verschiedene Oxidationsstufen, die sich in ihrer Toxizität und ihrem Adsorptionsverhalten zum Teil drastisch unterscheiden können. Im Körper kommt am häufigsten das  $\alpha$ -Tocopherol vor, welches lipidlöslich ist. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die Gabe von  $\alpha$ -Tocopherol die Lipidoxidation in Gewebe, das zuvor Ischämie-Reperfusion ausgesetzt war, deutlich reduzieren kann und so weniger Gewebenekrose auslöst [Marubayashi, Dohi et al. 1986]. Aufgrund seiner Lipophilie wird  $\alpha$ -Tocopherol allerdings sehr langsam zellulär aufgenommen, was seinen Einsatz im klinischen Alltag beschränkt, v.a. im Notfall [Ingold, Webb et al. 1987].

Das von uns verwendete Vitamin-E-Analogon Trolox scheint aufgrund seiner Wasserlöslichkeit eine vielversprechende Alternative zu  $\alpha$ -Tocopherol darzustellen, da es biologische Zellmembranen schnell durchdringen kann [Doba, Burton et al. 1985], um so eine rasche Protektion der Zelle vor Lipidperoxidation zu erreichen.

### 3.6 Stoffwechsel der Hämoxygenase (HO)

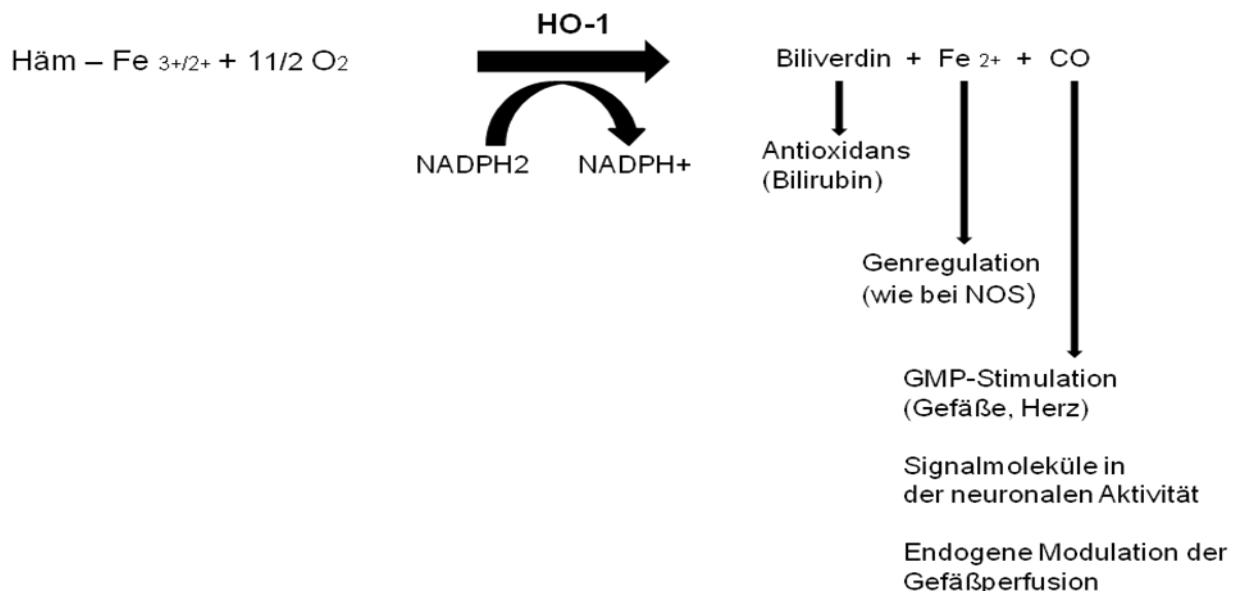
Die HO ist ein mikrosomales Enzym, das den Abbau von Häm zu Kohlenstoffmonoxid (CO), Biliverdin (BVD) und freiem Eisen (FE) katalysiert [Abraham, Mitrione et al. 1988]. BVD wird daraufhin durch die BVD-Reduktase umgehend zu Bilirubin umgewandelt [Maines and Trakshel 1993] (s. Abb.3.3). Die HO existiert in 3 verschiedenen Isoformen, wobei in diesem Zusammenhang die induzierbare HO-1 die wichtigste Isoform darstellt. HO-1 wird in einer Vielzahl von Zellen exprimiert, u.a. in Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen, basophilen Leukozyten, Monozyten/Makrophagen aber auch in Neutrophilen und Fibroblasten. Die



Induktion des Enzyms wird durch zahlreiche Situationen bedingt, so auch durch oxidativen Stress, Exposition von Cytokinen oder NO, Endotoxine, Häm und während einer Ischämie-bedingten Entzündungsreaktion [Tenhunen, Marver et al. 1969; Willis, Moore et al. 1996; Terry, Clikeman et al. 1998; Datta and Lianos 1999; Alcaraz, Fernandez et al. 2003; Vicente, Guillen et al. 2003]. Zusätzlich sind auch zahlreiche Erkrankungen mit der Expression der HO-1 assoziiert, wie z.B. der Bluthochdruck, die akute Pankreatitis, Asthma und Krebserkrankungen [Ishizaka, de Leon et al. 1997; Sato, Siow et al. 1997; Horvath, Donnelly et al. 1998; Doi, Akaike et al. 1999].

Die Metabolite der HO rufen viele verschiedene biologische Effekte hervor. CO z.B. zeigt Eigenschaften, die denen des NO sehr ähnlich sind. So reguliert es beispielsweise den Vasotonus, neuronale Signalwege und die Antinozizeption [Morita, Perrella et al. 1995; Maines 1997; Steiner, Branco et al. 2001].

Das in unserer Studie verwendete BVD zeigte in anderen Studien wichtige antioxidative Eigenschaften [Stocker, Yamamoto et al. 1987]. Freitas et al. konnten 2006 zeigen, dass BVD das Neutrophilen-Rolling sowie deren Adhäsion und Migration während der akuten Entzündungsreaktion an und durch Endothelwände reduzieren kann. In den letzten Jahren demonstrierten zahlreiche Studien, dass HO-1 und ihr Substrat Häm bzw. das von uns eingesetzte Hämin in der Lage sind, den Entzündungsprozess zu modulieren.



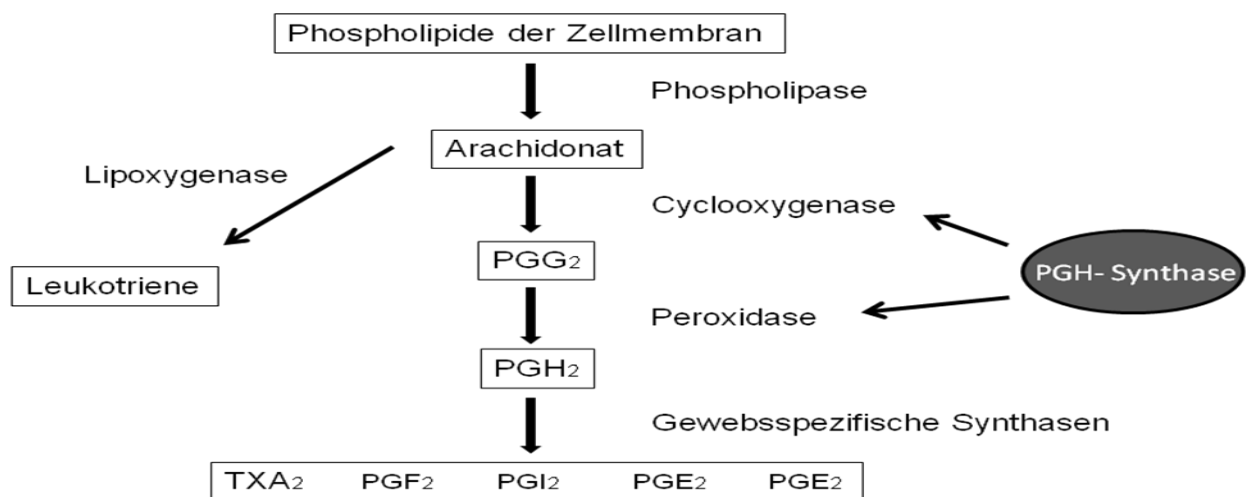
**Abb. 3.3** Enzymreaktion der HO-1: Die HO-1 nutzt Häm als Substrat, um in einer Oxidationsreaktion Biliverdin, ein Antioxidans, Eisen und Kohlenmonoxid (Modulator der Gefäßperfusion) entstehen zu lassen.

## 3.7 Gewebeentzündung

Im bisherigen Teil der Arbeit wurde v.a. auf die Wirkung antioxidativer Substanzen in Bezug auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies während anhaltender Ischämie eingegangen. Anhaltende Ischämie bedingt durch Zelluntergang (Apoptose und / oder Nekrose) nicht nur oxidativen Stress, sondern bewirkt auch eine Gewebeentzündung, die die Wundheilung beeinträchtigt bzw. die Ausbildung von Gewebenekrosen in kritisch ischämischem Lappengewebe fördern kann.

### 3.7.1 Cyclooxygenasen und Prostaglandine

Als Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels kommt der Cyclooxygenase (Cox) eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Gewebeentzündung zu. Sie ist zusammen mit der Lipoxygenase für die Herstellung von Prostaglandinen (PGL), Thromboxanen und Leukotrienen, also zusammenfassend den Eikosanoiden, zuständig. Eikosanoide sind Derivate mehrfach ungesättigter Fettsäuren, v.a. der Arachidonsäure, welche in den meisten tierischen Geweben produziert werden und dort Reaktionen auf unterschiedliche Stimuli (z.B. hormoneller Art), aber auch auf Entzündungsreize vermitteln (s. Abb. 3.4)



**Abb. 3.4** Der Arachidonsäurezyklus: Durch die Phospholipase wird aus Phospholipiden der Zellmembran Arachidonsäure abgespalten. Diese wird durch die Cox zunächst zum instabilen PGL<sub>2</sub> (Prostaglandin 2) oxidiert und schließlich durch die Peroxidase zum PGL H<sub>2</sub> umgewandelt. Je nach enzymatischer Ausstattung der Zelle werden dann weitere PGL ausgeschüttet [Lüllmann, Pharmakologie und Toxikologie].

Die Cox existiert in 2 verschiedenen Isoformen [Jones, Carlton et al. 1993], deren Gene sich auf 2 unterschiedlichen Chromosomen befinden. Die Proteinstruktur der beiden Enzyme ist zu einem hohen Prozentsatz identisch, sie haben denselben Reaktionsmechanismus und ähnlich starke Affinität zu ihrem Substrat, der Arachidonsäure. Allerdings unterscheiden sie sich in ihrem Expressionsmuster und in ihrer Sensitivität gegenüber Medikamenten, den nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAID).

Die Cox-1 ist in vielen Zellarten ubiquitär vorhanden und quasi dauerhaft aktiv. Die PGL, die durch sie entstehen, sind vor allem für viele physiologische Funktionen im Körper zuständig, so z.B. für den Schutz der Magenschleimhaut oder für die Regulation des renalen Blutflusses.

Die Cox-2 hingegen wird nur in wenigen Organen physiologisch exprimiert. Hervorzuheben ist, dass die Cox-2 im Rahmen pathophysiologischer Vorgänge, wie z.B. bei Entzündungsreaktionen, induziert wird. Durch die Produktion des PGE<sub>2</sub> kommt es zu einer Vasodilatation mit Erhöhung der Durchblutung sowie zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität (Leakage). Gleichzeitig werden Schmerzrezeptoren aktiviert, so dass das typische Bild der Entzündung „Calor, Rubor, Tumor, Dolor“ entsteht. Entsprechend kann der Einsatz von Hemmstoffen der Cox-2 antiphlogistische Wirkungen zu Tage führen [Lüllmann].

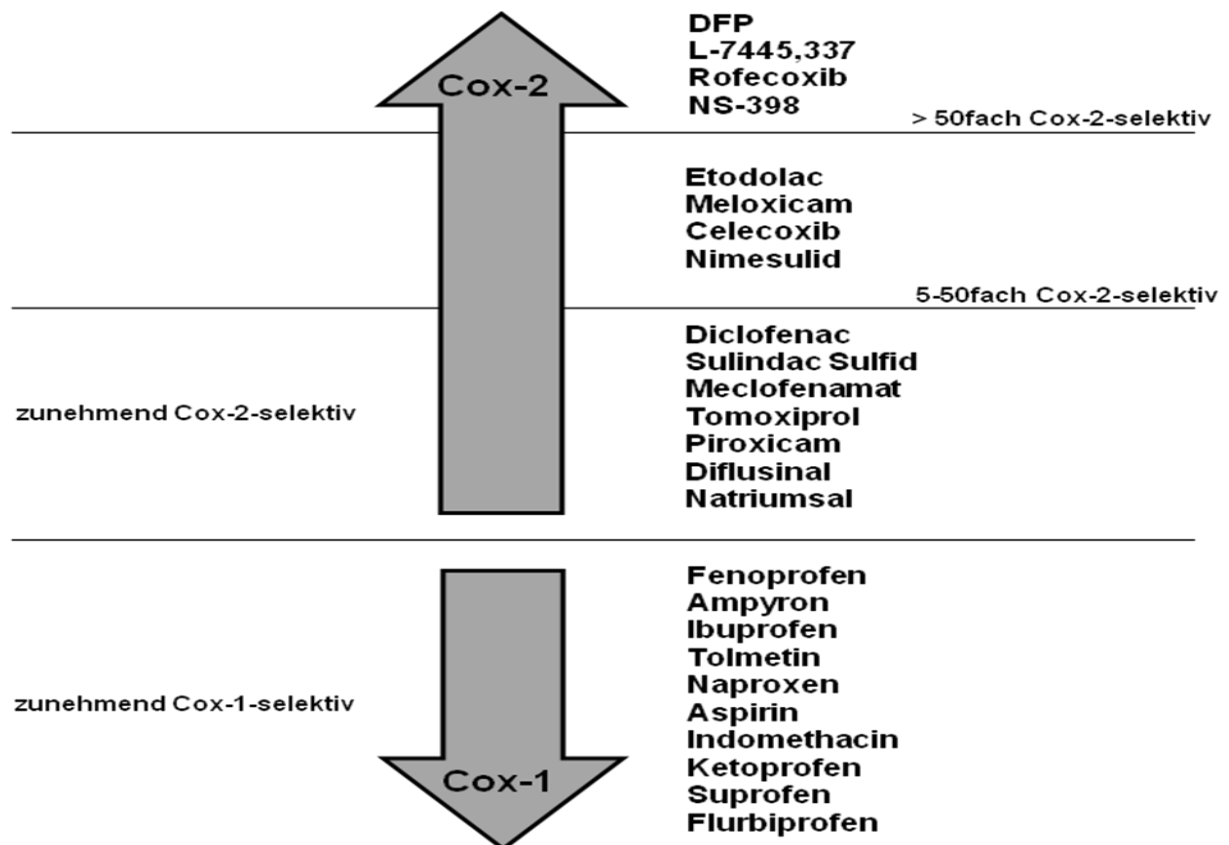
Mittlerweile hat man in einer Vielzahl von Studien festgestellt, dass noch andere Isoformen der Cox existieren, über deren Funktion man heute allerdings noch wenig weiß [Chandrasekharan, Dai et al. 2002].

### **3.7.2 Inhibitoren der Cyclooxygenasen und Cox-2-Selektivität**

Als Hemmer der Cox sind die NSAID weit verbreitet. Die NSAID reagieren mit dem aktiven Zentrum des Enzyms durch Verhindern der Arachidonsäurebindung, ohne dabei Einfluss auf die Peroxidaseaktivität des Enzymes zu nehmen [Smith and Marnett 1991].

Aspirin beispielsweise, der Vertreter „par excellence“ der nicht selektiven NSAID, hemmt die Cox durch kovalente Bindung irreversibel. Es hat als Antipyretikum und Antiphlogistikum große Bedeutung erlangt, seine entscheidende Verwendung ist jedoch die der Thrombozytenaggregationshemmung. Ein großer Nachteil bei der dauerhaften Anwendung der nicht selektiven NSAID ist nicht nur die Unterdrückung der Cox-2 sondern auch diejenige der Cox-1, was zu gefährlichen Nebenwirkungen, wie z.B. Blutungen, gastrointestinale Ulzera und Nierenschäden führen kann.

Man hat deshalb versucht, die Cox-2-Selektivität der NSAID zu erhöhen. Durch chemische Modifizierung funktioneller Gruppen der Bindungsstelle für NSAID war es so möglich, selektive Cox-2 Inhibitoren herzustellen [Warner, Giuliano et al. 1999] (s. Abb.3.5).



*Abb. 3.5 Cox-Selektivitäten für die Indikation der Cox-1 oder Cox-2 nach Warner*

Eine mehr als 50-fach höhere Selektivität für die Cox-2 als für die Cox-1 hat auch das in dieser Studie angewendete NS 398.

NS 398 wurde bereits häufig zur Reduktion von entzündlichen Reaktionen unterschiedlicher Ursache und in der Tumorforschung.

Welchen Einfluss NS 398 in unserem Lappenmodell hat und ob die Ischämie-bedingte Entzündungsantwort durch die selektive Inhibition der Cox-2 reduziert und so das Lappenüberleben verbessert wird, wurde bisher noch nicht untersucht und ist somit Gegenstand dieser Studie geworden.

### 4. Fragestellung

Anhaltende Gewebeischämie stellt insbesondere bei der Lappenpräparation in der plastischen Chirurgie ein Problem dar, denn die distalen Lappenanteile (randomisiert durchblutete Lappenareale) sind einer Hypoxie bzw. Anoxie ausgesetzt. Unbehandelt entwickelt sich eine Gewebeentzündung, die durch oxidativen Stress ausgelöst wird, sowie eine endotheliale Dysfunktion, die mit einer partiellen oder gar vollständigen Lappennekrose einhergehen kann.

Es gibt unterschiedliche experimentell-methodische Ansätze, wie man diese ischämischen Komplikationen am Lappen verhindern bzw. reduzieren kann, wie z.B. lokale physikalische Maßnahmen (z.B. Kühlung, Hitzevorbehandlung) oder systemische Verabreichung von Substanzen (z.B. Erythropoietin, Endothelinrezeptorantagonisten) zur Präkonditionierung.

Die nicht körpereigenen Antioxidantien NAC und Trolox erwiesen sich in zahlreichen Studien als erfolgreiche Radikalfänger und konnten so Schäden, ausgelöst durch ROS nach Ischämie-Reperfusion (I/R) mindern. Ebenso konnten den körpereigenen Antioxidantien Biliverdin, ein Abbauprodukt der HO-1, und dem Hämin, ein HO-1 Substrat, in diversen Studien antioxidative Eigenschaften nachgewiesen werden und Entzündungsprozesse und somit I/R-Schäden eindämmen. Die selektive Blockade der Cox-2 durch NS 398 wurde bereits häufig erfolgreich zum Schutz von Gewebe gegen I/R eingesetzt. Die Mehrheit dieser Versuche wurde an Akutmodellen durchgeführt und boten somit nicht die Möglichkeit über einen längeren Zeitraum die Entwicklung der Mikrozirkulation zu beobachten. Außerdem wurden häufig I/R-Modelle verwendet. Es ist jedoch nicht definitiv geklärt, ob diese Substanzen in einem chronischen Ischämiemodell ohne Reperfusion und Reoxygenation die gleiche Wirksamkeit aufweisen.

Ziel dieser Studie war es zu analysieren, welchen protektiven Einfluss die Gewebeprebehandlung bzw. Behandlung mit körpereigenen (Biliverdin, Hämin) und nicht körpereigenen Substanzen (NAC, Trolox) sowie antientzündlich wirkenden Substanzen (NS 398) auf die Mikrozirkulation in kritisch ischämischem Haut-Muskelgewebe hat. Kann die Gewebeprebehandlung die Ischämie-induzierte Entzündungsantwort und den apoptotischen Zelltod reduzieren, den arteriellen Zufluss und somit die Kapillardurchblutung aufrecht erhalten um letztlich der Nekroseentstehung vorzubeugen? Weiter sollte untersucht werden, ob die Substanzen im Lappen Angiogenese induzieren und damit zur Protektion beitragen.

# 5. Material und Methodik

## 5.1 Versuchstiere

Sämtliche Tierversuche wurden entsprechend der Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Experimente waren von der saarländischen Ethikkommission und der Tierschutzbeauftragten Frau Dr. med. vet. Frings geprüft und zugelassen. Als Versuchstiere wurden weibliche und männliche C57BL/6 Mäuse verwendet, die aus eigener Zucht (Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) stammten. Das Körpergewicht der Mäuse lag zu Versuchsbeginn zwischen 20 und 25 Gramm, was einem Tieralter zwischen 8 und 12 Wochen entspricht. Bis zum Beginn der Versuchsreihe befanden sich die Mäuse in der Tierhaltung des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, welche unter der Leitung von Prof. Dr. M.D. Menger und unter der Aufsicht der Tierschutzbeauftragten Frau Dr. med. vet. Frings steht. Nach Durchführung der einzelnen Versuche und an den versuchsfreien Tagen kehrten die Mäuse in die Tierhaltung zurück, wo ihnen eine Raumtemperatur zwischen 22 und 24°C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 60-65% und ein 12 Stunden Tag- und Nachtzyklus gewährleistet wurde. Die Tiere wurden ab dem Beginn der Versuche in Einzelkäfigen gehalten. Während der Versuchsperiode hatten die Mäuse freien Zugang zu Standardlaborfutter (Fa. Altromin, Lage, Deutschland) und Trinkwasser *ad libitum*.

## 5.2. Modell

### 5.2.1 Anästhesie

Alle Abschnitte des Versuchs, d.h. die Rasur und vollständige Enthaarung der Maus mit Enthaarungscreme (elca<sup>®</sup> med, Asid Banz GmbH, Herrenberg, Deutschland) 24 Stunden vor der Operation, das Anbringen der Rückenhautkammer inklusive Präparation des muskulokutanen Lappens sowie die wiederholte intravitale Fluoreszenzmikroskopie an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 nach Lappenpräparation wurden am narkotisierten Tier durchgeführt. Das Anästhetikum wurde stets auf die gleiche Art und Weise hergestellt und bestand aus 90mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet<sup>®</sup>, Parke Davis, Freiburg, Deutschland) und 25

mg/kg KG Dihydroxylidinothiazinehydrochlorid (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen, Deutschland). Die Injektion erfolgte intraperitoneal, wobei jeweils 0,1ml Bolus pro 10g Körpergewicht verabreicht wurde. Bei Bedarf musste bei Erwachen der Tiere, v.a. nach wiederholten Narkosegaben, 0,05ml bis 0,1ml des Anästhesiegemisches nachinjiziert werden. Im Durchschnitt hielt die Narkosewirkung für 30 bis 45 Minuten an. Während dieser Zeit war für das Tier Analgesie und Anästhesie gewährleistet. Trotz wiederholten Injektionen an mehreren aufeinander folgenden Tagen tolerierten die Tiere die Anästhesie ohne Probleme. Sie zeigten keinerlei Beeinträchtigung ihrer Putz-, Fress- und Schlafgewohnheiten.

### 5.2.2 Vorbereitung

Die Tiere wurden vor jedem Versuch, d.h. rund 24 Stunden vor geplantem Anbringen der Rückenhautkammer und Präparation des muskulokutanen Lappens, auf die gleiche Art und Weise vorbereitet. Zunächst wurden die Tiere wie oben beschrieben anästhesiert. Anschließend erfolgte eine grobe Rasur des Rückenfalls mit einem elektrischen Rasierer (Elektrall, Bullacher AG, Homburg, Deutschland). Die Haarentfernung wurde durch Enthaarungscreme vervollständigt. Diese wurde jeweils für 2 mal 10 Minuten aufgetragen, und danach mit lauwarmem Leitungswasser abgespült. Um den Flüssigkeitsverlust der Tiere während der Vorbereitungszeit unter Narkose auszugleichen, erhielten die Tiere 0,3ml Natriumchlorid (NaCl 0,9%) mittels intraperitonealer Injektion. Bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere vor einer Rotlichtlampe (Philips, Deutschland) platziert, um einen Wärmeverlust zu verhindern.

Die erste Injektion der untersuchten Substanzen fand bei vier der sechs Behandlungsgruppen und bei der NaCl-Kontrollgruppe 30 Minuten vor geplanter Präparation statt und bedurfte keiner weiteren Präkonditionierungsmaßnahmen. Ausnahmen bildeten die Hämin-Behandlungsgruppe und die zugehörige Dimethylsulfoxid (DMSO)-Kontrollgruppe, die die erste und einzige Injektion schon 18 Stunden vor geplanter Operation erhielten (Details siehe Kapitel 5.2.3).

### **5.2.3 Chemikalien**

#### **5.2.3.1 Körpereigene antioxidativ wirkende Substanzen**

##### **5.2.3.1.1 Biliverdin**

Biliverdinhydrochlorid (Frontier Scientific, Lancaster, UK) ist ein Spaltprodukt beim Zerfall von Hämoglobin, welchem auch antioxidative Eigenschaften zugeschrieben werden. Es entsteht beim Abbau des Hämoglobins bzw. des Hämatoporphyrins, welches zusammen mit Eisen den Häm-Anteil des Blutes bildet. Es ist eine Vorstufe des Bilirubins. Dieser Stoff wurde in 20%igem DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, in Eppendorfhütchen bei -20°C eingefroren und erst kurz vor der intraperitonealen Verabreichung aufgetaut. Die Verabreichung von jeweils 0,025ml der Lösung in der Dosierung 50mg/kg KG erfolgte intraperitoneal eine halbe Stunde vor geplanter Operation und dann alle 24 Stunden bis zum 10. Tag der Versuchsreihe.

##### **5.2.3.1.2 Hämin**

Hämin (Iluka) gehört zur Gruppe der Hämine (Chloroeisen(III)Porphyrin-Koordinationskomplexe) und wird auch als Häm b bezeichnet. Hämin ist unlöslich in Wasser und verdünnten Säuren, aber löslich in starken Basen. Zusätzlich zu antioxidativen Eigenschaften wie Bilirubin ist es auch ein Induktor des Hitzeschockproteins (HO-1, HSP-32), welches indirekt zur Freisetzung von Kohlenmonoxid und damit zu Vasodilatation führt. Hämin wurde direkt vor geplanter Injektion in DMSO (100%) gelöst. Bis zur Verwendung wurde Hämin im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Injektion erfolgte einmalig intraperitoneal 18 Stunden vor geplanter Operation. Es wurden dabei je 0,025ml der Lösung in der Dosierung 25mg/kg KG verabreicht.

#### **5.2.3.2 Nicht körpereigene antioxidativ wirkende Substanzen**

##### **5.2.3.2.1 Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carbonsäure)**

Trolox (Sigma Chemical Co., Frankreich) ist ein antioxidativ wirkendes wasserlösliches Vitamin-E-Analogon. Die aktive Form des Vitamin E ist das  $\alpha$ -Tocopherol.



Als lipidlösliches Antioxidans kann es ungesättigte Fettsäuren vor Oxidation schützen. Es wirkt als Radikalfänger, indem es selbst zu einem reaktionsträgen, mesomeriestabilen Radikal wird. Trolox wurde vor jeder Injektion frisch in 1ml PBS (phosphate buffered saline) angesetzt (6mg/kg KG). Um den Stoff vollständig im Lösungsmittel aufzulösen, musste die Lösung für 3 Minuten in ein kaltes Ultraschallbad (Ultrasonifikation) gelegt werden. Trolox wurde bis zur Anwendung lichtgeschützt bei einer Raumtemperatur von 23°C gelagert und bei Bedarf intraperitoneal verabreicht. Es wurden je 0,1ml/10g KG in der Dosierung 6mg/kg KG intraperitoneal injiziert. Die erste Injektion erfolgte 30 Minuten vor der geplanten Operation des Tieres und dann alle 12 Stunden bis zum 10. Tag der Versuchsreihe.

### **5.2.3.2.2 N-Acetylcystein (NAC)**

NAC (Sigma Chemical Co.) wirkt wie Trolox antioxidativ. Es besitzt die Eigenschaft, die Bildung von Glutathion in der Leber zu aktivieren, welches als Substrat der Glutathionperoxidase Zellen und andere Strukturen vor Oxidation schützen kann. Es wurde vor jeder Anwendung frisch in 1ml reiner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) aufgelöst (10mg/kg KG). Bis zu seiner Lösung wurde NAC im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Verabreichung erfolgte subkutan. Es wurden je 0,1ml/10g KG NAC in der Dosierung 10 mg/kg KG zum ersten mal 30 Minuten vor geplanter Operation, dann alle 24 Stunden bis zum 10. Tag der Versuchsreihe verabreicht.

### **5.2.3.3 Antiinflammatorische Substanzen**

#### **5.2.3.3.1 NS 398**

NS 398 (Sigma Chemical Co.) ist ein selektiver Inhibitor der Cyclooxygenase 2 (Cox-2), welche zur Vermittlung der Entzündungsreaktion dient. Die Cox-2 wird bei Entzündungsprozessen in entzündeten Geweben vermehrt transkribiert. Außerdem kommt sie auch in proliferierenden Blutgefäßen vor und könnte zur Vermittlung von Angiogenese dienen, weshalb Inhibitoren auch in der Tumorforschung eingesetzt werden. Durch selektive Hemmung der Cox-2 wirkt NS 398 entzündungshemmend ohne die unerwünschten Nebenwirkungen der Cox-1 Hemmung, wie z.B. Magenblutungen oder Einschränkung der Nierenfunktion, auszulösen. Die Substanz wurde in 5%igem DMSO gelöst. Bis zu ihrer Verwendung wurde die fertige Lösung (0,8ml/kg KG) bei -20°C tief gefroren und erst kurz vor

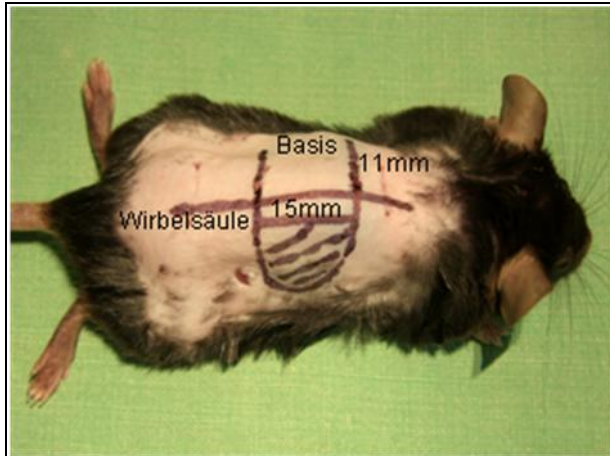
der Injektion aufgetaut. Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Es wurden je 0,2ml der Lösung der Dosierung 0,8ml/kg KG 30 Minuten vor der geplanten Operation und dann alle 24 Stunden bis zum 3. Tag nach Präparation des muskulokutanen Lappens verabreicht.

### 5.2.4 Präparation

Während der gesamten Studie wurde bei allen Tieren, d.h. sowohl bei den Kontrollgruppen als auch bei den Behandlungsgruppen die gleiche Operationstechnik angewendet und in standardisierter Art und Weise durchgeführt. Es handelt sich hierbei um die Anbringung einer chronischen Rückenhautkammer mit Hebung eines randomisiert durchbluteten Hautmuskellappens. Das Modell des "random pattern flap" ist ein modifiziertes Rückenhautkammermodell mit dem Ziel, einen lateral gestielten, senkrecht zur Wirbelsäule liegenden Lappen zu heben. Der Lappen bestand aus Haut und Panniculus carnosus und seine Maße betrugen 11mm in der Länge sowie 15mm in der Breite. Die Maße wurden so gewählt, dass sich regelmäßig eine ca. 50%ige Lappennekrose in der unbehandelten Kontrollgruppe entwickelte [Harder et al, 2004].

Wie in Abschnitt 5.2.2 schon beschrieben, wurden die Versuchstiere 24 Stunden vor Präparation des „random pattern flap“ rasiert und enthaart. Um das Infektionsrisiko zu minimieren, wurde nach erneuter Anästhesie präoperativ das Operationsfeld mit Softasept-Spray desinfiziert. Danach wurde die Maus horizontal vor einer Kalklichtlampe positioniert. Es wurde eine doppelagige Rückenhautfalte angehoben und unter Gegenlichtkontrolle verifiziert, dass die von rechts und links zuführenden Hauptgefäße parallel verliefen. Es handelte sich hierbei um Äste der tiefen A. circumflexa iliaca (deep circumflex iliac artery, DCIA) und der A. thoracica lateralis (lateral thoracic artery, LTA). Mit Haltenähten, die 2-3 mm rechts und links der versorgenden Gefäße angebracht wurden, wurde die Maus an einem Metallbalken fixiert. Ein Teil des Titanrahmens der standardisierten Rückenhautkammer wurde vorübergehend an der dem Lappen zugewandten Seite der doppelagigen Hautfalte platziert und ebenfalls mittels Haltenähten fixiert. Mit Hilfe zweier Schrauben, die vorher schon an dem Kammerteil angebracht worden waren und nun als Orientierung dienten, wurde mit einer gebogenen Mikroschere die Hautschicht an 2 Stellen perforiert. Die dadurch entstandenen Löcher dienten später zur Anbringung des zweiten Kammerteils. Der Titanrahmen konnte nun wieder entfernt werden. Nach erneuter horizontaler Positionierung des Tieres wurde mit einem wasserfesten Hautstift (Edding®) die Begrenzung des Lappens (Länge x Breite: 15x11mm) in einem Abstand von 2mm zur kontralateralen Seite eingezeichnet. Auch am distalen Ende der Hautfalte wurde mit 2mm

Abstand zur Gegenseite eine Kennzeichnung vorgenommen und anschließend durch einen Halbkreis ergänzt. Das Hautareal, welches durch den Halbkreis begrenzt wurde, sollte später als Histologiematerial dienen (s. Abb. 5.1).



**Abb. 5.1** C57BL/6 Maus mit eingezeichneten Lappenmaßen, sowie Darstellung der Wirbelsäulenebene und der Basis des Lappenpedikels von der die Gefäße nach Durchtrennung der lateralen Lappenanteile entspringen.

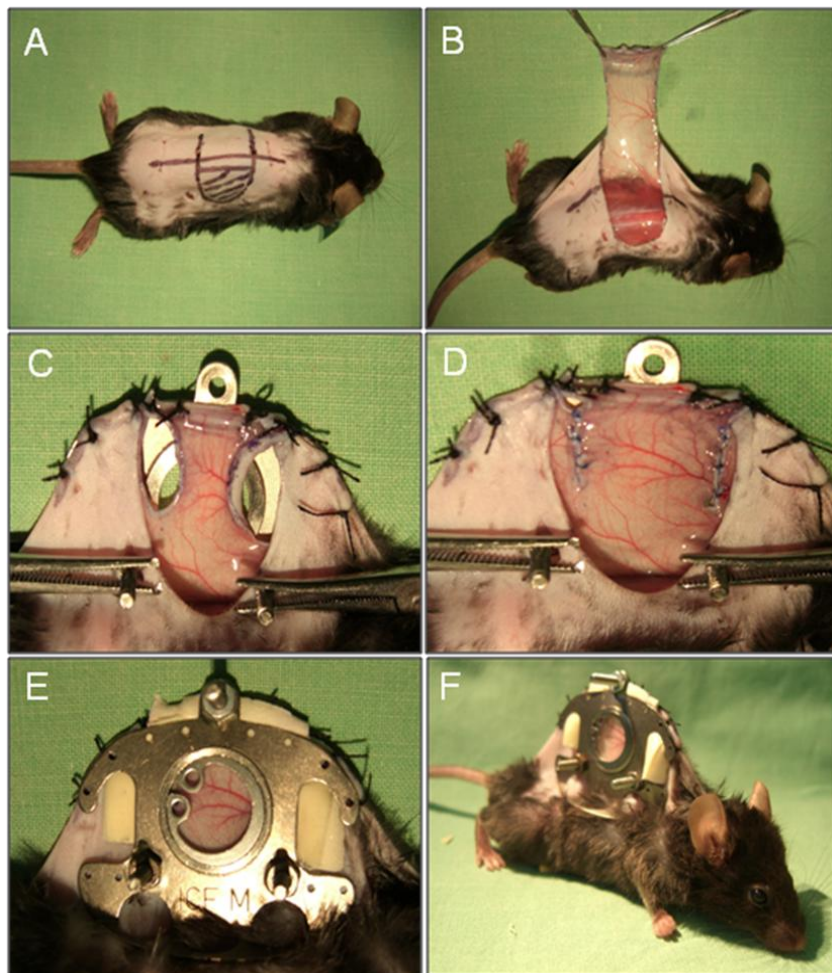
In einem nächsten Schritt erfolgte die Hebung des Lappens. Dabei wurde mit Hilfe einer geraden Mikroschere die vertikale Inzision der seitlichen Lappenschenkel vorgenommen. Dies hatte zur Folge, dass die laterale Blutversorgung des Lappens durch die oben erwähnten Gefäße DCIA und LTA durchtrennt und die Durchblutung des Lappens nun nur noch über den basalen Pedikel erfolgte. Die verbleibende Hautschicht, bestehend aus Epidermis, subkutanem Fettgewebe und Muskel wurde nun erneut an der Rückseite des Titaniumrahmens fixiert. Auch die rechts und links seitlich des Lappens überstehenden Hautfalten wurden mit dem Kammerteil vernäht. In einem nächsten Schritt wurden die lateralen Seiten des Lappens unter Aufsichtsmikroskopie (Leika m651) in 160-facher Vergrößerung mittels je 3 Einzelknopfnähten in die umgebende Haut zurückgenäht, so dass die Adhäsion der beiden Hautseiten sowie der Verschluss der Kammer gewährleistet waren. Es wurde dazu nicht resorbierbarer Prolene 6/0-Faden verwendet. Dieser Teil der Präparation erfolgte unter ständiger Befeuchtung des Gewebes mit NaCl (0,9%), um die schnelle Austrocknung des Lappens zu vermeiden.

Ebenfalls unter mikroskopischer Aufsicht mit 160-facher Vergrößerung wurde nun mikrochirurgisch die dem Muskel direkt aufliegende Gallertschicht (loose areolar tissue) entfernt, um auf diese Weise eine Ödembildung zu vermeiden und eine direkte Sicht auf die zu untersuchenden Gefäße zu ermöglichen. Um die Präparation abzuschließen, wurde nun das zweite Kammerteil mit der schon angebrachten ersten Kammerhälfte abgedeckt und verschraubt (s. Abb. 5.2). Auf das noch offene Sichtfenster, also der frei liegenden Innenfläche der Haut wurden 1-2 Tropfen Bisbenzimid (Hoechst®, Fa.Sigma, Chemical Co., Frankreich.)

aufgetragen, welches, wie später beschrieben, zur Visualisierung der Zellkerne diente.

Nach 1-2 Minuten Einwirkzeit wurde der überschüssige Farbstoff mit NaCl gespült und die runde Kammeröffnung mit einem Deckglas versehen und mit einem Kupfersprengerring luftdicht abgeschlossen. Die zu untersuchende Haut und Muskelschicht legte sich durch Adhäsionskräfte an das Deckglas an. Insgesamt benötigte der Eingriff eine Operationszeit von 20 bis 25 Minuten.

Bis zu Ihrem Aufwachen wurden die Versuchstiere mit einer Rotlichtlampe bestrahlt, damit sie durch die Narkose keine Unterkühlung erlitten. Sowohl die Operation als auch die Anästhesie und die Implantation der Titaniumkammer wurden von den Tieren ohne Probleme toleriert.



**Abb. 5.2** Operative Technik zur Hebung des „random pattern flaps“ dargestellt in mehreren Schritten: (A) Eingezeichneter Lappen (Breite/Länge: 15mm/11mm) auf der Rückenhaut der Maus mit einem 2mm Ausläufer zur Gegenseite. Um die Rückseite des Lappens durch das Sichtfenster zu untersuchen, musste zusätzliches Gewebe entfernt werden (gestrichelter Bereich). (B) Hebung des lateral gestielten Lappens. An der Lappenbasis ist deutlich die zufällig angeordnete Gefäßarchitektur zu sehen (Pfeil). (C) Befestigung des Lappens an der

Kammerrückseite. (D) Vernähung der lateralen Lappenschenkel mit der Rückenhaut, um die Dichtigkeit der Kammer zu gewährleisten. (E) Vollständig präparierte Rückenhautkammer mit Deckglas und Sprengring, sowie des beidseits und oben sichtbaren weißen Schaumstoffes, der die Kammer zusätzlich abdichtet. (F) Maus mit angebrachter Rückenhautkammer und „random pattern flap“.

### 5.2.5 Versuchsanordnung

Für die Versuche wurden insgesamt 50 C57BL/6 Mäuse verwendet, die randomisiert in 8 Gruppen, d.h. 3 Kontrollgruppen und 5 Behandlungsgruppen, aufgeteilt wurden.

#### 1. Körpereigene Antioxidantien

- DMSO-behandelte Kontrollkammern mit Lappen (Kontrollgruppe, n=3)
- Hämin-behandelt Kammern mit Lappen (n=7)
- Biliverdin-behandelte Kammern mit Lappen (n=7)

#### 2. Nicht körpereigene Antioxidantien

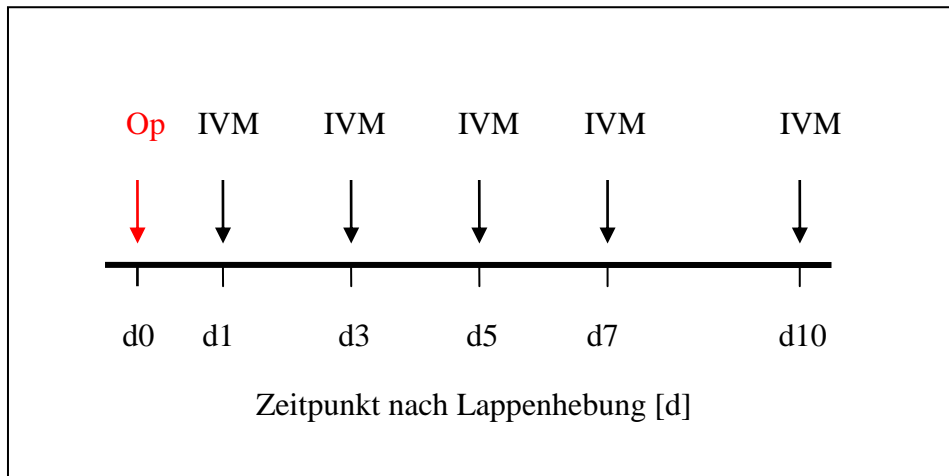
- Kontrollkammern mit unbehandelten Lappen (n=9)
- Trolox-behandelte Kammern mit Lappen (n= 7)
- NAC-behandelte Kammern mit Lappen (n=8)

#### 3. Antiinflammatorische Substanz (Cox-2-Hemmer, NS 398)

- Kontrollkammern mit unbehandelten Lappen (n= 8)
- NS 398-behandelte Gruppe mit Lappen (n=8)

Genau 24 Stunden nach Präparation der Lappenkammer begann die wiederholte Mikroskopie, die an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 nach dem gleichen Schema durchgeführt wurde.

Am 10. Tag nach der Operation wurden die Tiere mit einer Überdosis des Anästhetikums euthanasiert (s. Abb. 5.3).



**Abb. 5.3** Skizze des Versuchsablaufs: d0 bezeichnet den Tag der Operation (Op). Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) fand an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 nach Lappenpräparation statt. Am 10. Tag nach Beginn des Versuchs wurden die Tiere euthanasiert.

### 5.3 Untersuchungsmethoden

#### 5.3.1 Mikrozirkulation

##### 5.3.1.1 Farbstoffe

##### 5.3.1.1.1 Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)

Fluoreszein-Isothiozyanat (Sigma Chemical) ist an Dextran gekoppelt und hat das Molekulargewicht 150.000 Dalton. Da das Molekül mit diesem Molekulargewicht bei intakter Permeabilität nicht aus dem Gefäß entweichen kann, dient es der Kontrastverstärkung von Blutgefäßen. Das Exzitationsmaximum von FITC liegt bei ~490 nm. Das Fluorochrom wird renal und hepatisch metabolisiert und ausgeschieden. Der Farbstoff wurde bis zur Verwendung tiefgefroren bei -20°C aufbewahrt.

##### 5.3.1.1.2 Rhodamin 6G

Rhodamin 6 G (Sigma Chemical Co.) ist ein roter fluoreszierender Farbstoff mit dessen Hilfe Leukozyten und Blutplättchen in vivo angefärbt werden können. Der

Farbstoff entfaltet seine Wirkung indem er an Cytochrom C in Leukozyten und in Thrombozyten bindet und diese so unter der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar macht. Die Emissionswellenlänge des Rhodamins liegt bei ~590 nm, sein Exzitationsmaximum befindet sich bei ~530 nm. Die intravenöse Injektion von 0,05ml 1%igem Farbstoff erfolgte retrobulbär in einer 1:1 Mischung zusammen mit 0,05ml 5%igem Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC). Bis zur Verwendung wurde der Farbstoff bei -20°C aufbewahrt.

### **5.3.1.1.3 Bisbenzimid H 33342**

Der Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst®) wird zur Färbung von Chromatin verwendet. Er bindet bevorzugt an AT-reiche Sequenzen und kann zu Lesefehlern in der Mitose und von vielkernigen Zellen führen. RNA wird durch diesen Farbstoff nicht gebunden. Mit Hilfe von Bisbenzimid können Zellkerne und Chromosomen direkt an lebenden Zellen markiert werden, denn im Rahmen der Apoptose kommt es zur Fragmentierung, Marginierung und Kondensierung dieser Zellkerne. Unversehrte Kerne, aber auch die durch Apoptose entstandenen Kernfragmente, können mittels der Kernfärbung dargestellt werden. Da Hoechst® spezifisch an zelluläre DNA bindet, besteht der Unterschied zwischen normaler und apoptotischer Zelle darin, dass kondensiertes Chromatin vermehrt fluoresziert.

### **5.3.1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie**

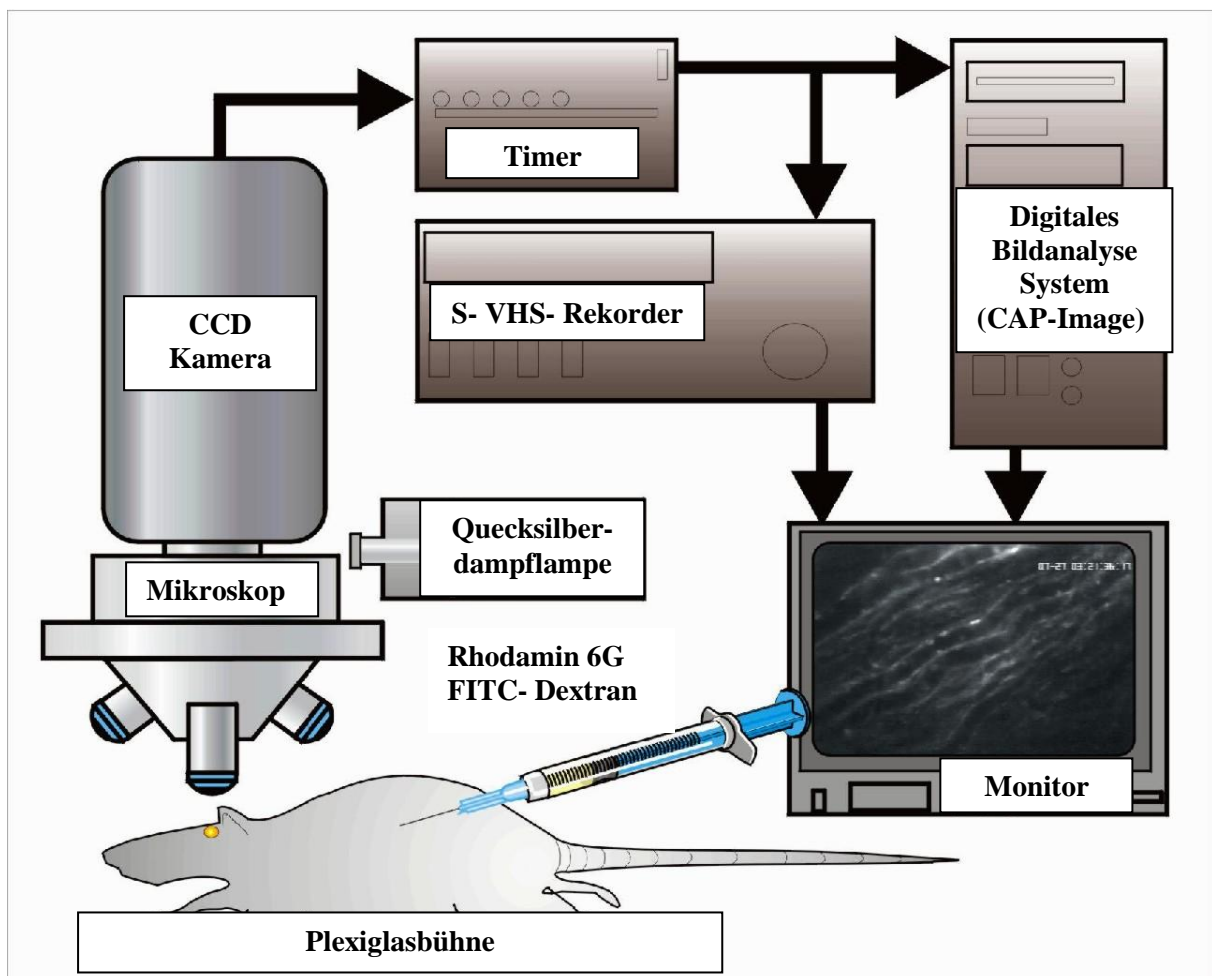
Alle Aufnahmen zur intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurden mittels eines Zeiss-Axiotech-Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Dieses war ausgestattet mit einer 100 Watt HBO Quecksilberdampflampe, die zur Auflichtbeleuchtung installiert war. In das Strahlengangsystem konnten verschiedene Filterblöcke eingeschoben werden, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge filtern und so selektiv den jeweiligen Farbstoff sichtbar machen konnten. Die Blöcke beinhalteten Filter für blaues Licht (Anregungswellenlänge: 450 bis 490 nm; Emissionswellenlänge: > 520 nm), grünes Licht (Anregungswellenlänge: 530 bis 560nm; Emissionswellenlänge: >580nm) und für ultraviolettes Licht (Anregungswellenlänge: 330 bis 390nm; Emissionswellenlänge: >430nm). Für die Untersuchungen wurden drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die im Kapitel 5.3.1 bereits genauer beschrieben wurden: Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC-Dextran, Molekulargewicht 150 000), Rhodamine 6G und Bisbenzimid (Hoechst®). Die mikroskopischen Bilder und Flussequenzaufnahmen wurden von einer hochempfindlichen CCD (charge coupled device)-Videokamera (FK 6990: Pieper, Schwerte, Deutschland)

aufgezeichnet und über einen Bildschirm (PVM 1371-QM, Sony corp., Tokio, Japan) an einen VHS Videorekorder (Panasonic, AG- 7350- SVHS; Mitsushita, Tokio, Japan) übermittelt. Zwischen Videokamera und Bildschirm war ein Video-Zeitgenerator (VTG 33, FOR-A Company Ltd., Tokio, Japan) zwischengeschaltet, der eine Aufzeichnung und Paralleleinblendung von mikroskopischer Videoaufnahme und Identifikationsnummer des Tieres ermöglichte, welche die Gruppenzugehörigkeit und die Nummer des Tieres sowie den Zeitpunkt der Aufnahme nach Lappenhebung beinhaltete (s. Abb. 5.4).

Zur Mikroskopie wurden verschiedene Objektive verwendet. Ein 5x Objektiv (Zeiss, Oberkochen) für Übersichtsaufnahmen und zur systematischen Erfassung der nekrotischen Gewebefläche, ein 20x Objektiv und ein 40x Wasser-Immersionsobjektiv (Zeiss Axioplan 20x W/0,5, 40x W/0,5, Zeiss, Oberkochen) für detailliertere Aufnahmen, sowie ein 63x Wasser-Immersionsobjektiv zur Erfassung des apoptotischen Zelltodes.

Nach Verabreichung der üblichen Dosis wurden die Farbstoffe in den retrobulbär liegenden Venenplexus injiziert und das narkotisierte Tier in Rechtsseitenlage auf einer eigens für diesen Zweck hergestellten Plexiglasplatte mit entsprechender Vorrichtung fixiert. So wurde erreicht, dass die Kammer plan aufliegt und das Gewebe unter dem Mikroskop problemlos fokussiert werden kann.





**Abb. 5.4** Versuchsaufbau des Epifluoreszenzmikroskopes: Auf einer Plexiglasbühne wurde das Versuchstier in lateraler, dekubitaler Lage unter den Objektiven des Mikroskops positioniert. Die Bühne sorgte für eine standardisierte, horizontale Lage der Maus. Die Aufnahmen der Mikrozirkulation des Lappens wurden unter Verwendung unterschiedlicher Filter mit Hilfe einer in das Mikroskop integrierten CCD-Kamera angefertigt. Die Kamera war über einen Videozeitgenerator (Timer) mit einem Monitor verbunden, der das entsprechende Bild anzeigte. Ein S-VHS-Rekorder zeichnete die relevanten Sequenzen auf Videobändern auf, die dann zur weiteren Bearbeitung an einem computergestützten Auswertungssystem (Cap Image<sup>®</sup>) verwendet wurden

## 5.3.2 Ablauf der intravitalmikroskopischen Untersuchung

Die intravitale Epi-Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Mikrozirkulation wurde für alle Versuchstiere in einem abgedunkelten Raum bei einer konstanten Raumtemperatur von 23° Celsius durchgeführt.

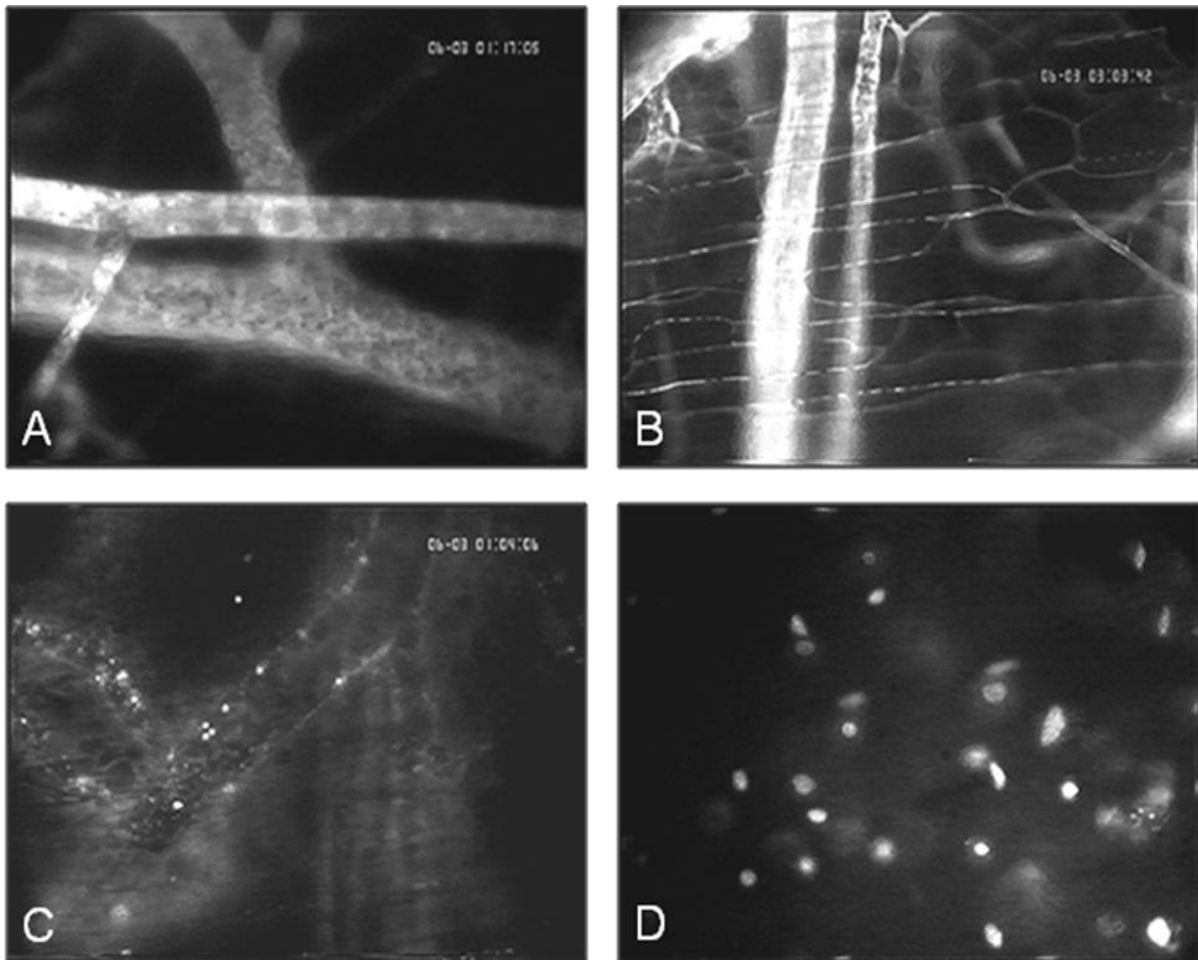
Jede Aufnahmereihe begann damit, dass das sich in der Beobachtungsfläche

befindliche Lappengewebe mittels eines 5x Objektiv systematisch Gesichtsfeld für Gesichtsfeld abgefahren und aufgenommen wurde. So konnte objektiv perfundiertes von nicht perfundiertem bzw. nekrotischem Gewebe unterschieden werden. Anschließend wurden jeweils für den proximalen, zentralen und distalen Lappenanteil ein Gefäßbündel (Hauptarteriole und Begleitvenule) bestimmt. Dieses wurde mit dem 5x Objektiv zufällig ausgesucht und mit dem 20x Objektiv für circa 20 Sekunden aufgenommen (s. Abb 5.6 A). Ebenfalls im 20x Objektiv wurde anschließend im Grünfilter das Leukozytenverhalten im Gefäßbündel untersucht, wobei über 30 Sekunden eine Gefäßaufzweigung der oben beschriebenen Bündel in den Fokus genommen wurde (s. Abb. 5.6 C). Jeweils am ersten Tag nach Präparation des Lappens wurde im 20x Objektiv zusätzlich ein Videoausdruck der Bündel angefertigt, damit auch im weiteren Verlauf der 10 Versuchstage das Bündel immer wieder eindeutig identifiziert werden konnte. Es wurde auch darauf geachtet, dass Bündel mit möglichst einfachem Verzweigungsmuster ausgewählt wurden, um eine Verwechslung der Gefäße auszuschließen. An diesen Gefäßbündeln fand später die Auswertung der Durchmesser, der Erythrozytenfließgeschwindigkeiten und des Blutflusses statt, ebenso erfolgte die Auszählung der adhärenen und rollenden Leukozyten (siehe Kapitel.6). Bei besonders guter Qualität der Aufnahmen fand zusätzlich eine detaillierte Leukozytenaufnahme im 40x Wasser-Immersionsobjektiv statt, die das Adhäsionsverhalten der Leukozyten an der Gefäßwand besonders gut darstellen konnte.

In einem nächsten Schritt wurden pro Lappenabschnitt drei dem Gefäßbündel direkt und indirekt benachbarte Kapillarfelder ausgewählt und während 30 Sekunden auf Video aufgezeichnet (s. Abb. 5.6 B). Die Anordnung der Kapillarfelder wurde genau skizziert um zu gewährleisten, dass über die 10 Tage immer wieder dieselben Kapillaren analysiert wurden. Mit Hilfe dieser Kapillarfelder wurde später der Kapillardurchmesser, die Fließgeschwindigkeit und daraus wiederum der volumetrische Blutfluss und die Kapillardichte ermittelt.

Abschließend wurden unter Verwendung des ultravioletten Filters und des aufgetragenen DNA-bindenden Farbstoffes Bisbenzimid die charakteristischen Zelltodzeichen der Kondensation, Fragmentation und Marginierung sichtbar gemacht (s. Abb. 5.6 D). Dazu wurden je drei charakteristische Felder im proximalen, zentralen und distalen Lappenabschnitt ausgewählt und unter systematischem Durchfokussieren aufgenommen.

Alle per Videoaufnahme festgehaltenen Parameter wurden unter Zuhilfenahme eines computergestützten Analysesystems (CapImage<sup>®</sup>; Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) off-line ausgewertet.



**Abb. 5.6** Beispielhafte Darstellung von intravitalmikroskopischen Bildern eines arterio-venulären Gefäßbündels (A), von perfundierten Kapillaren (B), der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (C) und des apoptotischen Zelltodes (D).

Bei nekrotischem Gewebeuntergang des distalen Lappenareals wurde auf die Erhebung und Auswertung der o.g. Parameter in diesem Abschnitt verzichtet.

### 5.3.3 Mikrozirkulatorische Parameter

#### 5.3.3.1 Nekrotische Gewebefläche

Die Angabe des nicht mehr perfundierten Lappenareals, d.h. der Nekrose, erfolgte in Prozent der Gesamtlappenfläche. Dazu wurde in jedem aufgenommenen Gesichtsfeld der noch durchblutete Anteil der Fläche durch Umrandung markiert und ausgewertet. Die

Flächen der jeweilig durchbluteten Areale wurden dann addiert und von der sichtbaren Lappenfläche von 89mm<sup>2</sup> (Fläche des Kammerfensters) subtrahiert. Entsprechend ergaben sich die Werte für die perfundierte und nekrotische Gewebefläche.

### **5.3.3.2 Gefäßdurchmesser**

Zur Erfassung des Gefäßdurchmessers der Arteriolen, der Venulen und der Kapillaren wurden jeweils 2 senkrecht zum Gefäßverlauf gegenüberliegende Stellen an der Gefäßwand ausgewählt und deren Abstand mehrmals ausgemessen. Nach etwa 3 bis 5 Messungen errechnete und erfasste der Computer einen Mittelwert in  $\mu\text{m}$ . Die Messung erfolgte am stehenden Bild.

### **5.3.3.3 Erythrozytenfließgeschwindigkeit**

Bei der Auswertung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (Red blood cell velocity: RBCV) wurde die „line shift-Methode“ angewendet. Hierzu registrierte der Computer über einen Zeitraum von 10 Sekunden Helligkeitsunterschiede in, vorher mit einer Messlinie markierten Gefäßen, die während der Aufnahmezeit entstanden. Dabei wurden die Messlinien mit Hilfe des Computerprogrammes mittig und horizontal zum Gefäßverlauf in das jeweilige Gefäß eingezeichnet. Nach Ablauf der 10 Sekunden wurde auf dem Bildschirm ein Raster mit Linien unterschiedlicher Helligkeit angezeigt. Dieses beinhaltet für jede der zuvor eingezeichneten Messlinien einen Streifen. Dieser stellt die Grauwerte entlang der Messlinie in einem x-y-Diagramm dar. Die x-Achse entspricht hierbei der Zeit, die y-Achse der Länge der jeweiligen Messlinie. Jeder Erythrozyt, der sich innerhalb der Messperiode entlang einer Messlinie bewegt, bewirkt eine schräge Linie im Diagramm. Die Steigung dieser Linien entspricht schließlich der Fließgeschwindigkeit und wird in mm/s angegeben.

### **5.3.3.4 Blutfluss**

Aus Erythrozytenfließgeschwindigkeit und Querschnittsfläche des Gefäßes ( $\pi \cdot r^2$ ) errechnete sich nach der Gleichung von Gross und Aroesty:  $Q = V \cdot \pi \cdot r^2$ , die von einer zylindrischen Gefäßform ausgeht, der individuelle volumetrische Blutfluss. Dieser wird in der Einheit pl/s angegeben.

### 5.3.3.5 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte entspricht der Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfeld und wird in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  angegeben. Hierbei wurden die 3 im proximalen, zentralen und distalen Lappenareal randomisiert ausgewählten Kapillarfelder eingestellt und die perfundierten Kapillaren am laufenden Bild markiert. Der Computer errechnete aus der Gesamtlänge der markierten Kapillaren pro Gesichtsfeld die Dichte der Kapillaren in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  (Cap image).

### 5.3.3.6 Apoptotischer Zelltod

Die Zellen zur Erfassung der Apoptosen wurden in den insgesamt neun (3x3) vorher definierten Beobachtungsfeldern direkt am Bildschirm ausgezählt und dokumentiert. Zur Identifizierung der apoptotischen Zellen dienten die charakteristischen morphologischen Zeichen des programmierten Zelltodes, d.h. die Kondensation, die Fragmentation und die Marginierung des nukleären Chromatins. Diese sind als hell leuchtende Punkte zu erkennen, da sie durch den kondensierten Farbstoff Bisbenzimid angefärbt werden [Westermann, Vollmar et al. 1999].

### 5.3.3.7 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Ebenso wurden die rollenden und adhärenen Leukozyten ausgewertet, welche Zeichen für eine Gewebeentzündung sind. Im Gegensatz dazu stehen die mit dem Strom fließenden Leukozyten, die in unserem Modell nicht einzeln sichtbar gemacht werden können, aber auch kein Zeichen für Entzündung darstellen. In einem definierten Beobachtungsfeld von  $100\mu\text{m}$  Gefäßstrecke, je nach Verlauf des Gefäßes in vertikaler oder horizontaler Richtung, wurden über einen Zeitraum von 30 Sekunden die durch Rhodamin 6G angefärbten adhärenen und rollenden Leukozyten beobachtet und gezählt und als adhärenen Leukozyten pro  $\text{mm}^2$  endothelialer Gefäßoberfläche bzw. als rollende Leukozyten pro Minute angegeben. Die Leukozyten wurden nur in Venolen erfasst.

Als adhärenen Leukozyt wird definitionsgemäß ein Leukozyt bezeichnet, der länger als 30 Sekunden an einer Stelle des Gefäßes haftet ohne sich weiterzubewegen. Als rollender Leukozyt wird ein Leukozyt definiert, der mit dem Endothel der Gefäßwand in Kontakt ist, aber weniger als 30 Sekunden an einer Gefäßstelle haftet.

### 5.3.3.8 Übersicht über die Untersuchungsparameter

Messparameter	Einheit
Nekrose	% der Gesamtfläche
Durchmesser Arteriole/Venule/Kapillare	µm
Erythrozytenfließgeschwindigkeit (RBCV)	mm/s
Volumetrischer Blutfluss (BF) art./ven./kap.	pl/s
Funktionelle Kapillardichte (FCD)	cm/cm <sup>2</sup>
Apoptose	Zellen/mm <sup>2</sup>
Adhärente Leukozyten	Leukozyten/mm <sup>2</sup> endothelialer Oberfläche
Rollende Leukozyten	Leukozyten/Minute

## 5.4 Datenerfassung und Statistik

### 5.4.1 Datenerfassung

Die Datenerfassung erfolgte während und nach der Videoauswertung am CAP-Image-System auf vorher eigens dafür angefertigten Erfassungsbögen. Die Daten wurden anschließend in Exceltabellen übertragen und mittels Microsoft-Excel-Software elektronisch gespeichert.

### 5.4.2 Statistische Bearbeitung

Für die Berechnung der statistischen Signifikanzen kam das Programm Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) zur Anwendung. Zum Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander und mit der Kontrollgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten der Versuchsreihe wurde bei normal verteilten Daten die One Way Analysis of Variance (ANOVA) angewendet.

Zur Durchführung multipler statistischer Auswertungen wurde der Students-Newman-Keul post hoc-Test verwendet. Als statistisches Signifikanzniveau wurde ein P-Wert kleiner 0,05 gewählt.

### 5.4.3 Graphische Darstellung

Zur graphischen Darstellung der Daten wurde das Programm Sigma Plot (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) zu Hilfe genommen. Die Angabe der Daten erfolgte stets als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM).

## 6. Ergebnisse

### 6.1 Körpereigene Antioxidantien

#### 6.1.1 Nekrotische Gewebefläche

In der mit DMSO vorbehandelten Kontrollgruppe bewirkte die Lappenhebung am ersten Tag nach Präparation einen Perfusionsausfall von circa 48% der Gesamtlappenfläche. Die anhaltende Ischämie führte schließlich an Tag 10 zu einer Lappennekrose von 43%. In der mit Biliverdin behandelten Gruppe fiel der initiale Perfusionsausfall mit 66% der Gesamtlappenfläche bereits an Tag 1 deutlich höher aus, um über die folgenden Tage aufgrund der persistierenden mikrovaskulären Dysfunktion auf 69% weiter anzusteigen ( $p < 0,05$  vs. Kontrolle). Obwohl der initiale Perfusionsausfall nach Hämingabe mit dem der Biliverdin-Behandlung vergleichbar war, beobachteten wir über die 10 Tage eine kontinuierliche Minderung des Perfusionsausfalles, die mit einer der Kontrollgruppe vergleichbaren Nekrose von nur ca. 53% letztlich lediglich im Vergleich zur Biliverdingruppe signifikant war (s. Abb 6.1.1).

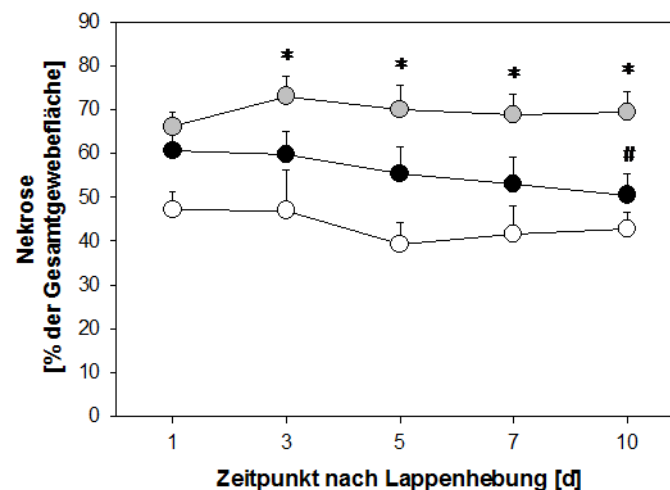


Abb. 6.1.1: Nekrose in % der Gesamtgewebefläche nach Hämin- (schwarze Kreise) bzw. Biliverdin- (graue Kreise) Vorbehandlung oder DMSO-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs DMSO; #  $p < 0,05$  vs Biliverdin.



### 6.1.2 Arteriöler Durchmesser (aDM)

Im proximalen Lappenareal nahmen die Durchmesser der Arteriolen in allen untersuchten Gruppen über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen nach Lappenhebung deutlich zu, ohne jedoch jemals signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu erreichen (arteriöle Dilatation Tag1 - Tag10: Kontrolle 20%, Hemin 30%, Biliverdin 25%) (s. Abb. 6.1.2 A).

Die gleiche Beobachtung wurde im zentralen Lappenareal gemacht. Auch wenn die aDM in den mit Hämin behandelten Tieren tendenziell etwas höher lagen als in den Tieren, denen Biliverdin und DMSO verabreicht wurde, so waren die Unterschiede doch nicht signifikant (s. Abb. 6.1.2 B).

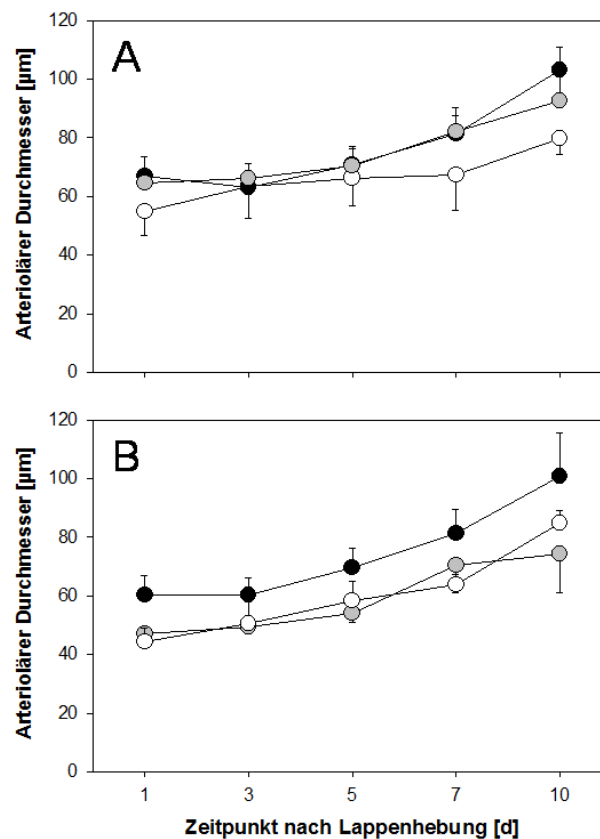


Abb. 6.1.2: Arteriöle Durchmesser in  $\mu\text{m}$  nach Hämin- (schwarze Kreise) bzw. Biliverdin- (graue Kreise) Vorbehandlung oder DMSO-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A) und zentralen (B) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 6.1.3 Arteriöläre Fließgeschwindigkeit (RBCV)

Hämin behandelte Tiere zeigten in allen drei Lappenabschnitten bereits nach Lappenhebung im Vergleich mit Biliverdin vorbehandelten Tieren und Kontrolltieren die höchsten Fließgeschwindigkeiten.

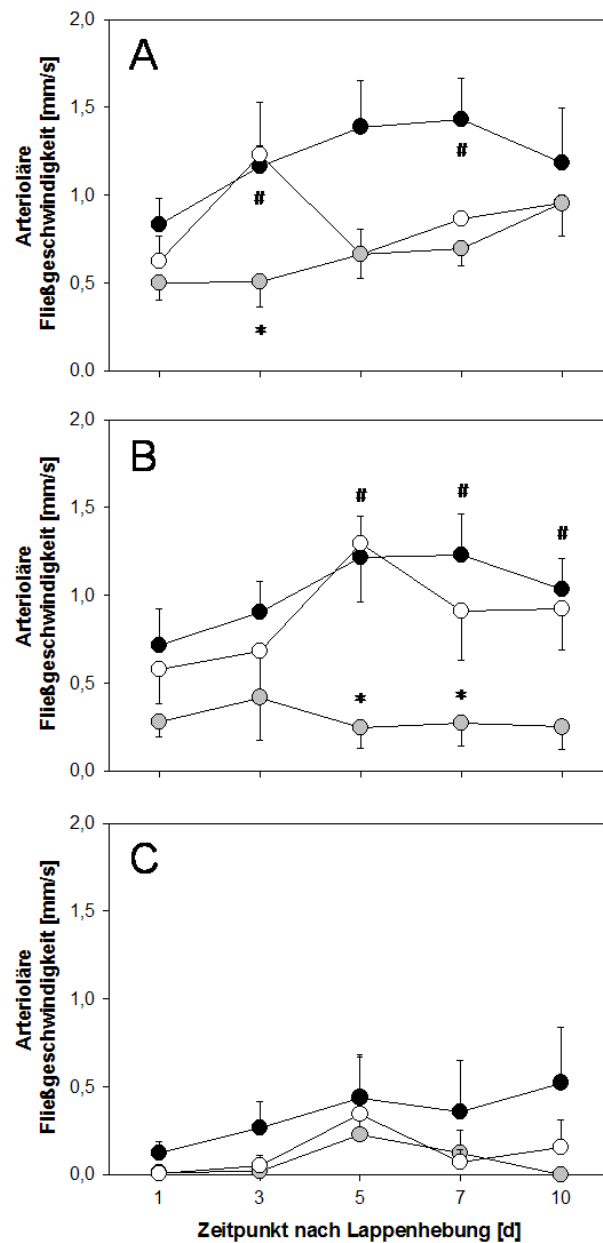


Abb. 6.1.3: Arteriöläre Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Hämin- (schwarze Kreise) bzw. Biliverdin- (graue Kreise) Vorbehandlung oder DMSO-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs DMSO; #  $p < 0,05$  vs Biliverdin.

Die mit Biliverdin vorbehandelten Tiere hingegen demonstrierten in allen drei Lappenabschnitten die langsamsten arteriölen Geschwindigkeiten, im distalen Lappenabschnitt kann man sogar davon ausgehen, dass der Blutfluss nahezu sistierte. Kontrolltiere zeigten von proximal bis distal im Lappen leicht geringere Fließgeschwindigkeiten als die mit Hämin vorbehandelten Tiere, jedoch ohne signifikante Unterschiede zu erreichen.

Es ist allerdings anzumerken, dass tendenziell über den Zeitverlauf in allen Lappenabschnitten eine Steigerung der RBCV zu verzeichnen war, insbesondere in den mit Hämin vorbehandelten Tieren (s. Abb. 6.1.3 A-C).

## 6.1.4 Arteriöler Blutfluss (aBF)

Im adäquat perfundierten proximalen Lappenareal zeigten alle Versuchsgruppen einen eindeutigen Anstieg des aBF.

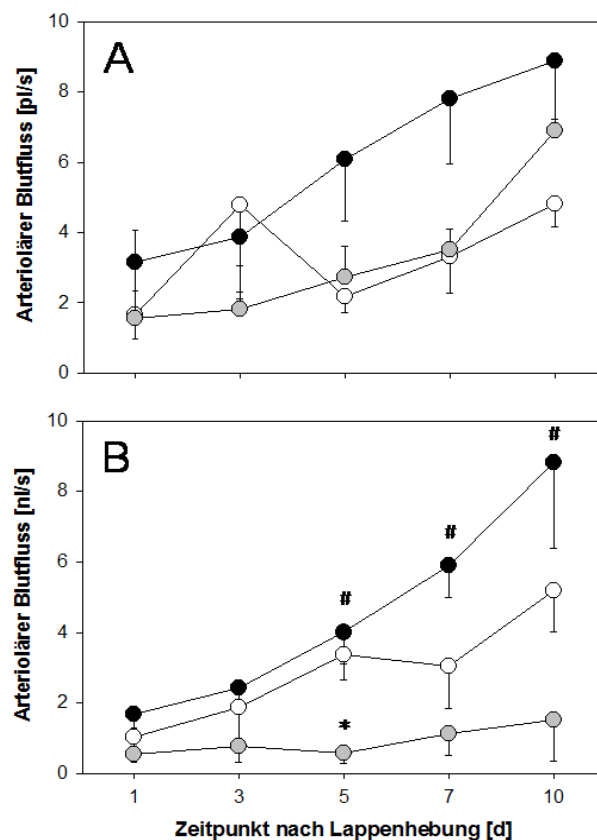


Abb. 6.1.4: Arteriöler Blutfluss in nl/s nach Hämin- (schwarze Kreise) bzw. Biliverdin- (graue Kreise) Vorbehandlung oder DMSO-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A) und zentralen (B) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs DMSO; #  $p < 0,05$  vs Biliverdin.

Dabei führte die Vorbehandlung mit Hämin sowohl gegenüber den Kontrollen als auch gegenüber den Biliverdin behandelten Tieren zu einer deutlich größeren Zunahme des aBF (s. Abb. 6.1.4 A). Im kritisch durchbluteten zentralen Lappenareal zeigten insbesondere die mit Hämin vorbehandelten Tiere einen drastischen Anstieg des aBF, der ab dem 5. Tag signifikant war ( $p < 0,05$  vs Biliverdin). Die Kontrolltiere zeigten ebenfalls einen deutlichen Anstieg des aBF, der jedoch ab dem 5. Tag gegenüber der Hämingruppe deutlich nachließ. Interessanterweise waren die mit Biliverdin vorbehandelten Tiere lediglich in der Lage einen marginalen aBF aufrechtzuerhalten (s. Abb. 6.1.4 B).

## 6.1.5 Venulärer Durchmesser (vDM)

Sowohl im proximalen als auch im zentralen Lappenareal beobachteten wir über den gesamten Versuchszeitraum eine konstante Zunahme der vDM.

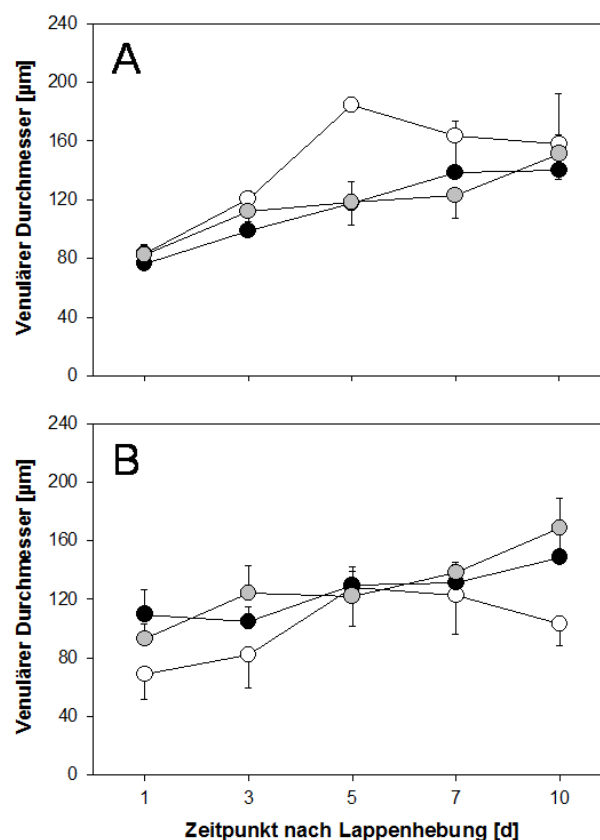


Abb. 6.1.5: Venulärer Durchmesser in µm nach Hämin- (schwarze Kreise) bzw. Biliverdin- (graue Kreise) Vorbehandlung oder DMSO-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A) und zentralen (B) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die dilatatorische Antwort in den Venulen von Kontrolltieren war v.a. im proximalen Lappenareal größer (Tag 5 und 7) und im zentralen Lappenareal leichtgradig geringer als in den Hämin- und Biliverdintieren (s. Abb. 6.1.5 A/B).

## 6.1.6 Venuläre Fließgeschwindigkeit (vFG)

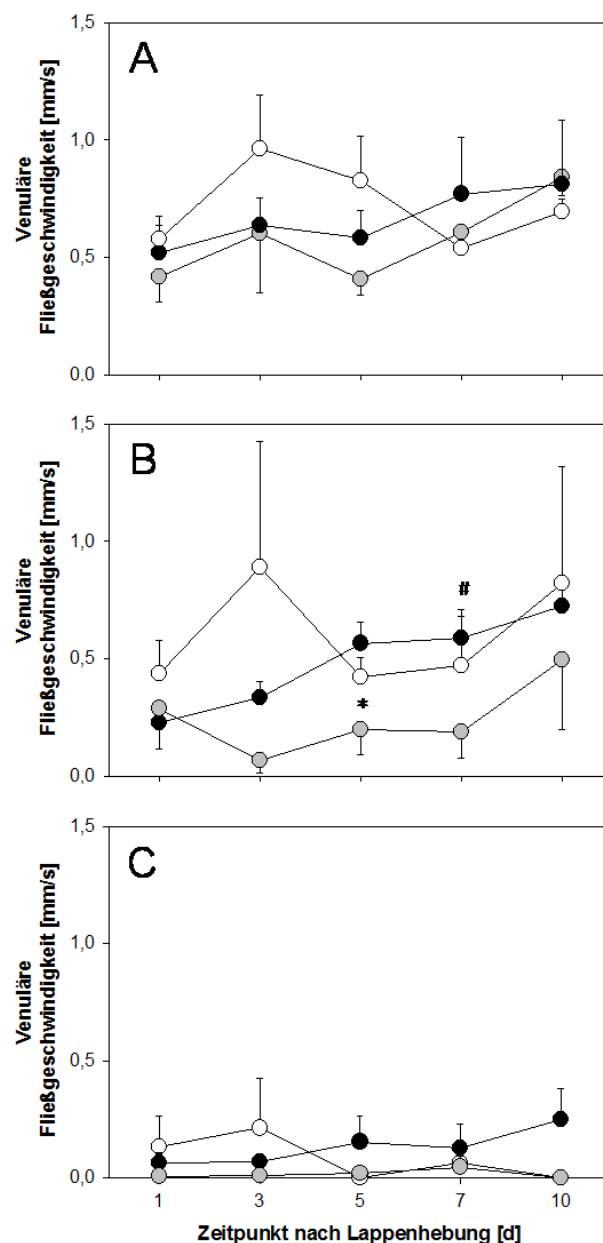


Abb. 6.1.6: Venuläre Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Hämin- (schwarze Kreise) bzw. Biliverdin- (graue Kreise) Vorbehandlung oder DMSO-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs DMSO; #  $p < 0,05$  vs Biliverdin.

Im proximalen Lappenareal nahm die vFG zunächst in allen Gruppen zu, was v.a. in der Kontrollgruppe deutlich wurde. Der Peak an Tag 3 war allerdings nur temporär so dass in den beiden Behandlungsgruppen am 5. Tag und in der Kontrollgruppe am 7. Tag nach Lappenhebung die Ausgangswerte wieder erreicht wurden. Zuletzt zeigten an Tag 10 aber alle 3 Versuchsgruppen eine leicht erhöhte vFG gegenüber Tag 1 nach Lappenhebung (s. Abb. 6.1.6 A). Dieser Verlauf war auch im zentralen Lappenabschnitt zu beobachten, jedoch zeigten die Versuchsgruppen hier größere Unterschiede der vFG untereinander (s. Abb. 6.1.6 B).

Die vFG war im distalen Lappenareal marginal. Lediglich die Vorbehandlung mit Hämin konnte eine geringfügige vFG aufrechterhalten (s. Abb. 6.1.6 C).

## 6.1.7 Venulärer Blutfluss (vBF)

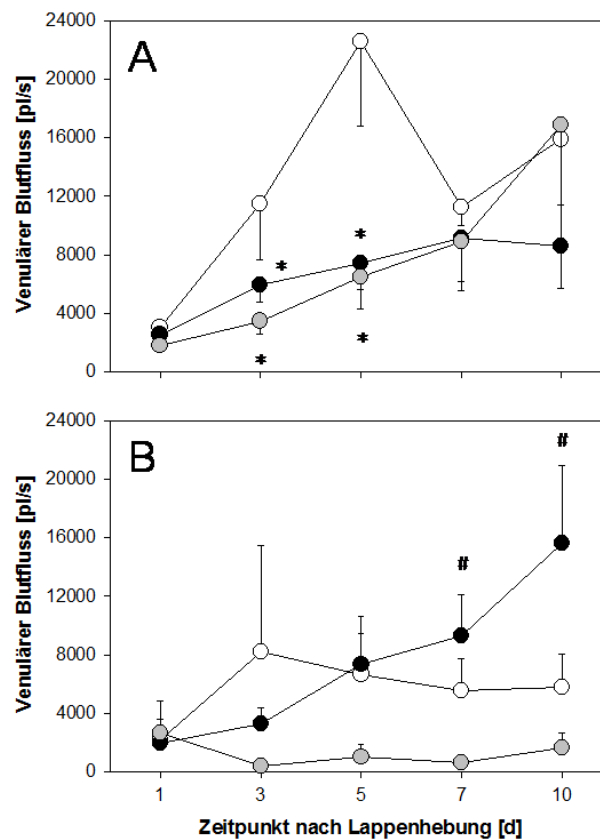


Abb. 6.1.7: Venulärer Blutfluss in pl/s nach Hämin- (schwarze Kreise) bzw. Biliverdin- (graue Kreise) Vorbehandlung oder DMSO-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A) und zentralen (B) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs DMSO; #  $p < 0,05$  vs Biliverdin.

Im adäquat durchbluteten proximalen Lappenareal zeigten alle drei Gruppen ähnliche Werte an Tag 1 sowie einen Anstieg des vBF bis zum Tag 10 nach Lappenhebung. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Lediglich die Kontrollgruppe wies an Tag 3 etwas höhere Werte auf (s. Abb. 6.1.7 A).

Im kritisch durchbluteten zentralen Lappenareal zeigte insbesondere Hämin einen signifikanten Anstieg des vBF im Vergleich zur Kontrollgruppe, die über den gesamten Versuchszeitraum eine konstante, aber adäquate Durchblutung aufrechterhalten konnte. Biliverdin war auch hier lediglich in der Lage einen marginalen vBF zu erhalten (s. Abb. 6.1.7 B).

## 6.1.8 Kapillarer Durchmesser (kDM)

Am 1. Tag nach Lappenhebung unterschieden sich die drei untersuchten Gruppen im proximalen Lappenareal deutlich bezüglich ihrer kDM.

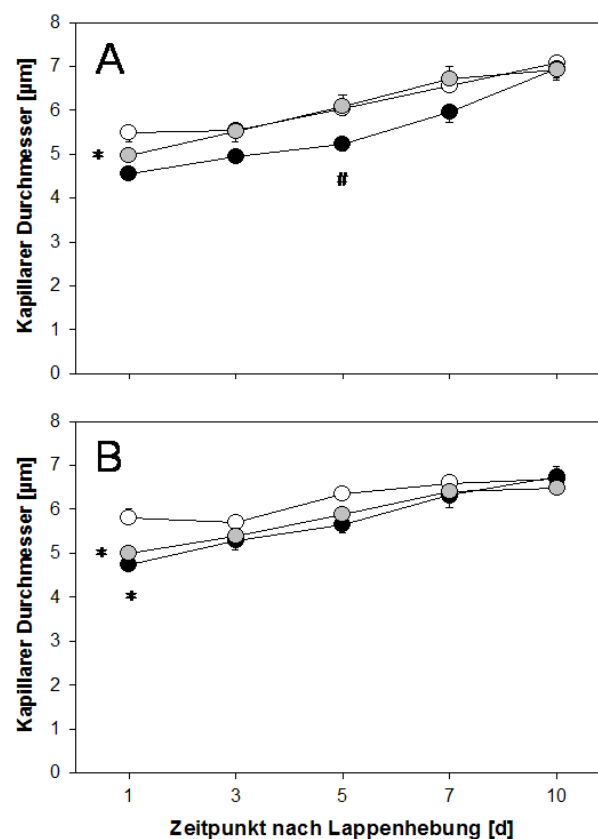


Abb. 6.1.8: Kapillarer Durchmesser in µm nach Hämin- (schwarze Kreise) bzw. Biliverdin- (graue Kreise) Vorbehandlung oder DMSO-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A) und zentralen (B) Lappenareal. Mittelwert ± SEM, \* p<0,05 vs DMSO; # p<0,05 vs Biliverdin.

Die mit Biliverdin behandelten Tiere wiesen signifikant kleinere Durchmesser auf als die mit DMSO vorbehandelten Kontrolltiere. Über die 10 Tage beobachteten wir jedoch eine Dilatation der Kapillaren, die in den 3 Versuchsgruppen vergleichbar war, um schließlich am 10. Tag einen Durchmesser von rund 6,5µm zu erreichen (s. Abb.6.1.8 A).

Die gleiche Beobachtung machten wir im kritisch perfundierten zentralen Lappenanteil, wobei auch hier lediglich am 1. Tag nach Lappenhebung signifikant unterschiedliche kDM zu beobachten waren (s. Abb. 6.1.8 B).

### **6.1.9 Kapillare Fließgeschwindigkeit (kFG)**

Im gut durchbluteten proximalen Lappenareal führte die Präparation der Rückenhautkammer in allen untersuchten Tieren bis zum 5. Tag nach Lappenhebung zunächst zu einer markanten, jedoch nicht signifikanten Steigerung der kFG, die dann jedoch stagnierte (s. Abb. 6.1.9 A ).



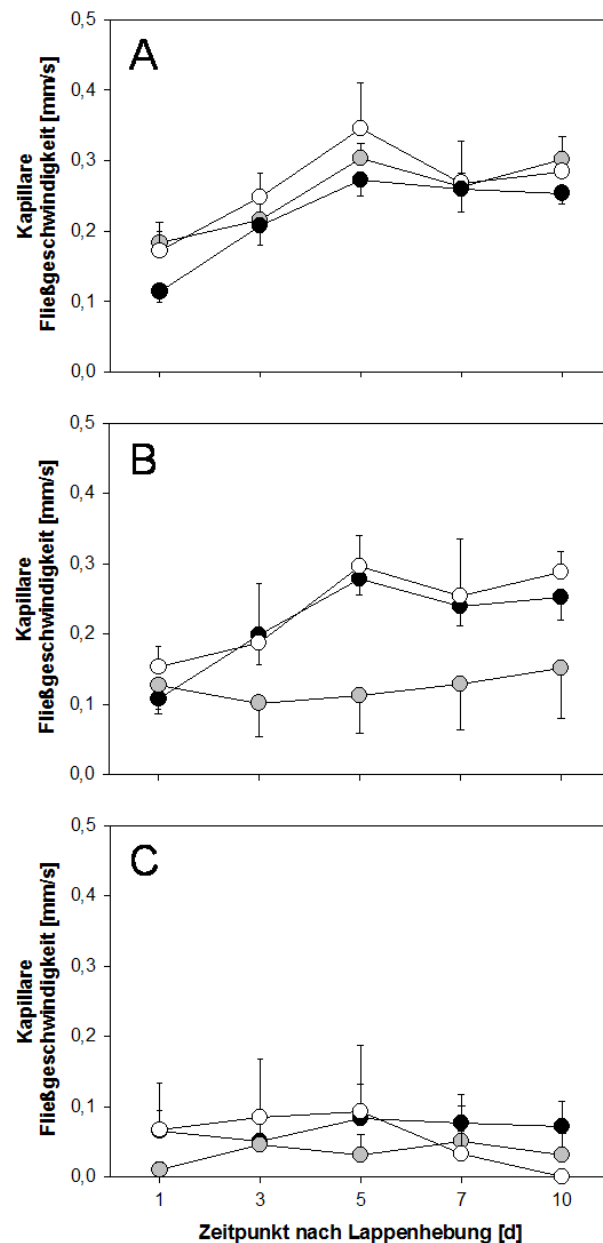


Abb. 6.1.9: Kapillare Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Hämin- (schwarze Kreise) bzw. Biliverdin- (graue Kreise) Vorbehandlung oder DMSO-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die gleiche Beobachtung machten wir im zentralen Lappenareal der Tiere. Im Gegensatz dazu konnte die Biliverdin-Vorbehandlung die Fließgeschwindigkeit nicht beeinflussen und blieb somit über den gesamten Versuchszeitraum deutlich unterhalb derjenigen der Kontroll- und Hämingruppe (s. Abb. 6.1.9 B).

Im distalen Lappenareal zeigte die kFG keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (s. Abb. 6.1.9 C).

### 6.1.10 Kapillarer Blutfluss (kBF)

Im proximalen Lappenareal kam es in allen untersuchten Gruppen zu einer massiven Steigerung des kBF über den Versuchszeitraum, wobei dieser in den mit Hämin vorbehandelten Tieren bis zum 5. Tag nach Lappenhebung signifikant geringer ausgeprägt war als in der mit Biliverdin vorbehandelten Gruppe und der Kontrollgruppe.

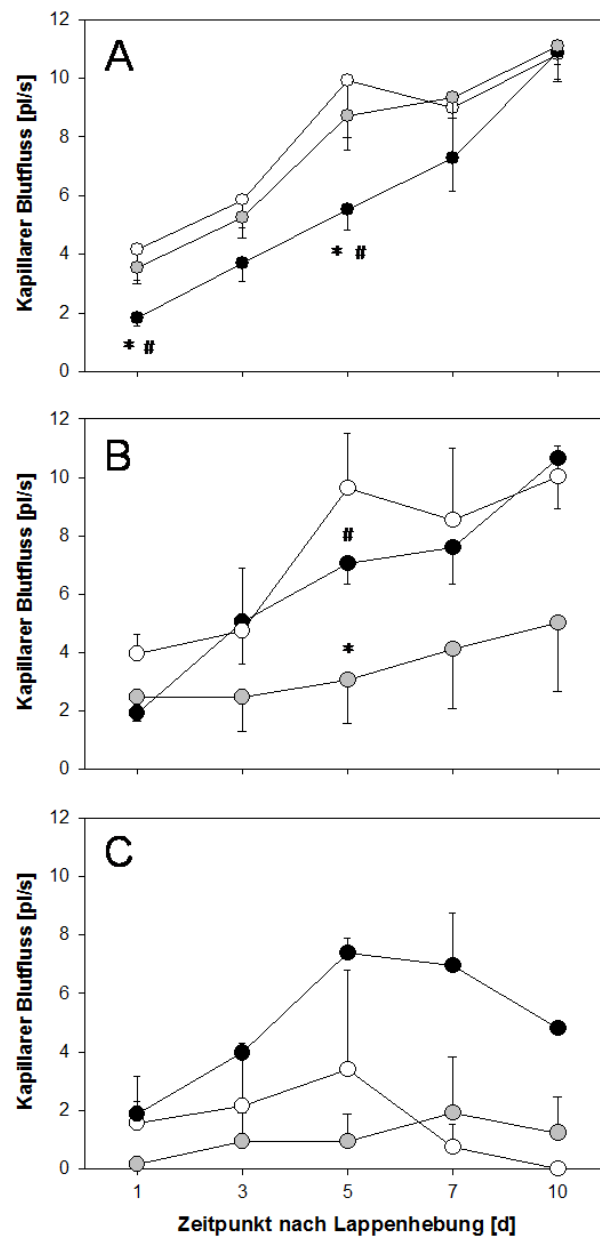


Abb. 6.1.10: Kapillarer Blutfluss in pl/s nach Hämin- (schwarze Kreise) bzw. Biliverdin- (graue Kreise) Vorbehandlung oder DMSO-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs DMSO; #  $p < 0,05$  vs Biliverdin.

Am 10. Tag nach Lappenhebung konnten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Gruppen festgestellt werden (s. Abb. 6.1.10 A).

Im kritisch durchbluteten zentralen Lappenareal fand in der mit Hämin vorbehandelten Gruppe und der Kontrollgruppe eine ähnlich starke Blutflusssteigerung über den Beobachtungszeitraum statt, wie im proximalen Lappenareal, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden konnten. Im Gegensatz dazu wiesen die mit Biliverdin vorbehandelten Tiere von Beginn des Versuches an einen signifikant niedrigeren kBF auf, der über die 10 Tage kaum gesteigert werden konnte (s. Abb. 6.1.10 B).

Während der kBF im distalen Lappenareal in der Kontrollgruppe sowie in der mit Biliverdin vorbehandelten Gruppe nahezu sistierte und keine Zunahme über den Versuchszeitraum erreichen konnte, nahm der Fluss in den mit Hämin vorbehandelten Tieren zunächst leicht zu, um dann aber am Ende des Beobachtungszeitraums nahezu wieder auf das Ausgangsniveau zurückzufallen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen fielen hier nicht auf (s. Abb. 6.1.10 C).

### **6.1.11 Funktionelle Kapillardichte (FKD)**

Im proximalen Lappenareal konnte die nutritive Perfusion der Kontrolltiere trotz leicht rückläufiger Tendenz über den Beobachtungszeitraum auf hohem Niveau aufrechterhalten werden. Die Behandlungsgruppen zeigten eine signifikant niedrigere initiale FKD, die jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum auf ausreichendem Niveau aufrechterhalten wurde und sich am Ende derjenigen der Kontrollgruppe annäherte (s. Abb. 6.1.11 A).

Im kritisch durchbluteten zentralen Areal waren die Kapillaren der Kontrollgruppe und der mit Hämin vorbehandelten Gruppe ähnlich dicht wie im proximalen Lappenareal, wohingegen in der mit Biliverdin vorbehandelte Gruppe die nutritive Perfusion bereits deutlich eingeschränkt war (s. Abb. 6.1.11 B).

Im distalen Lappenareal war keine der untersuchten Gruppen in der Lage, eine ausreichende nutritive Perfusion aufrechtzuerhalten (s. Abb. 6.1.11 C).

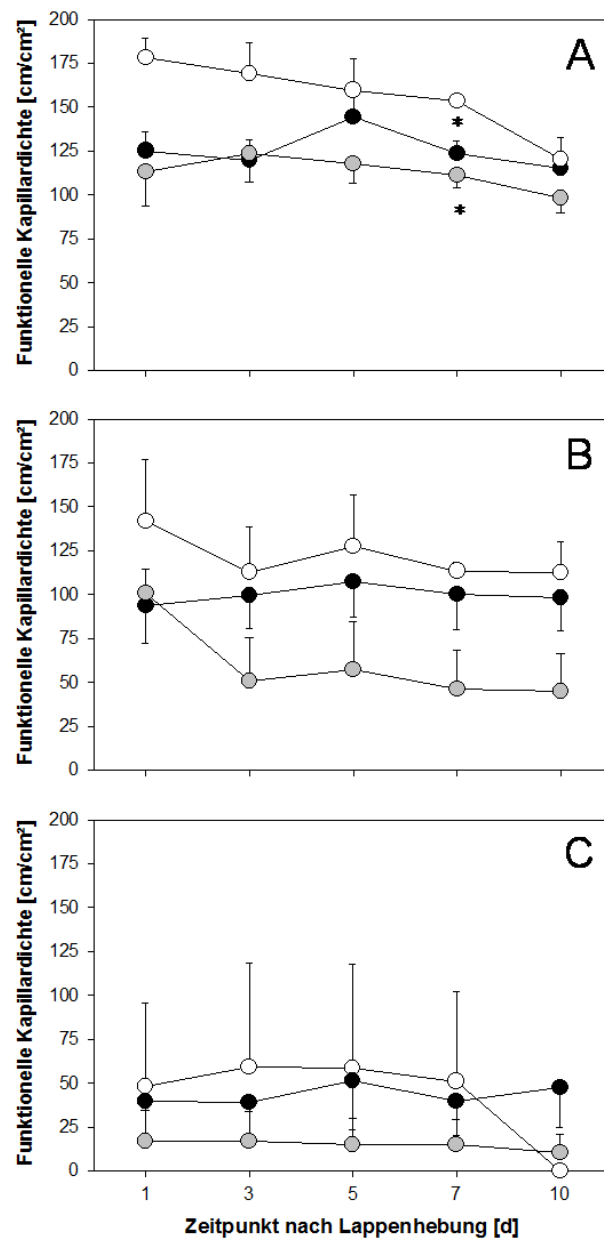


Abb. 6.1.11: Funktionelle Kapillardichte in cm/cm<sup>2</sup> nach Hämin- (schwarze Kreise) bzw. Biliverdin- (graue Kreise) Vorbehandlung oder DMSO-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs DMSO.

## 6.2 Nicht-körpereigene Antioxidantien

### 6.2.1 Nekrotische Gewebefläche

In der Kontrollgruppe (NaCl-Gabe) bewirkte die Lappenhebung am 1. Tag nach Präparation einen Perfusionsausfall von circa 50% der Gesamtlappenfläche. Die anhaltende Ischämie führte schließlich an Tag 10 zu einer Nekrose von 55%. Interessanterweise zeigte die Vorbehandlung mit NAC bereits an Tag 1 einen geringeren Perfusionsausfall von nur noch circa 35% gegenüber den Kontrollen, was schließlich zu einem um gut 1/3 verbesserten Lappenüberleben führte. Die Gabe des Vitamin E-Analogon Trolox konnte keinen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung des Lappenüberlebens leisten (s. Abb. 6.2.1).

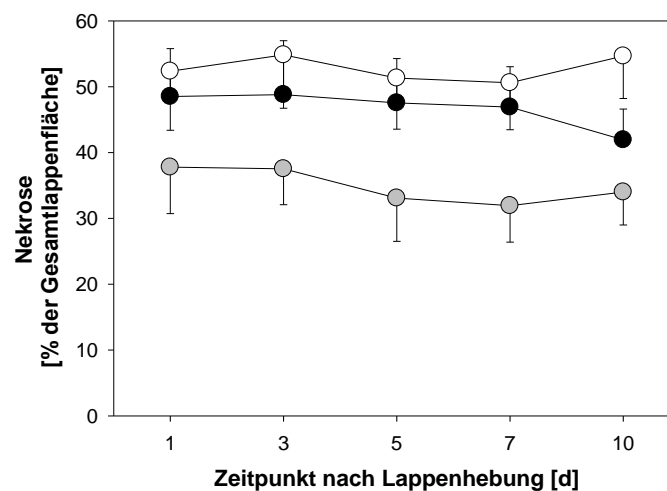


Abb. 6.2.1: Nekrose in % der Gesamtlappenfläche nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung. Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 6.2.2 Arteriöler Durchmesser

Im proximalen Lappenareal nahmen die Durchmesser der Arteriolen in allen 3 untersuchten Gruppen über den Versuchszeitraum von 10 Tagen nach Lappenhebung deutlich zu, ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu zeigen (Abb. 6.2.2 A).

Die gleiche Beobachtung wurde im zentralen Lappenareal gemacht. Interessanterweise waren die Durchmesser der Arteriolen in den mit NAC vorbehandelten Tieren am 10. Tag nach Lappenhebung signifikant höher als in den mit Trolox und NaCl vorbehandelten Tieren (Abb. 6.2.2 B).

Obwohl die vorbehandelten Versuchsgruppen an Tag 1 und 10 nach Lappenhebung

vergleichbare Gefäßdurchmesser aufwiesen, beobachteten wir zwischen Tag 3 und Tag 7 im kritisch perfundierten distalen Lappenareal eine signifikante Verringerung der aDM (s. Abb. 6.2.2 C).

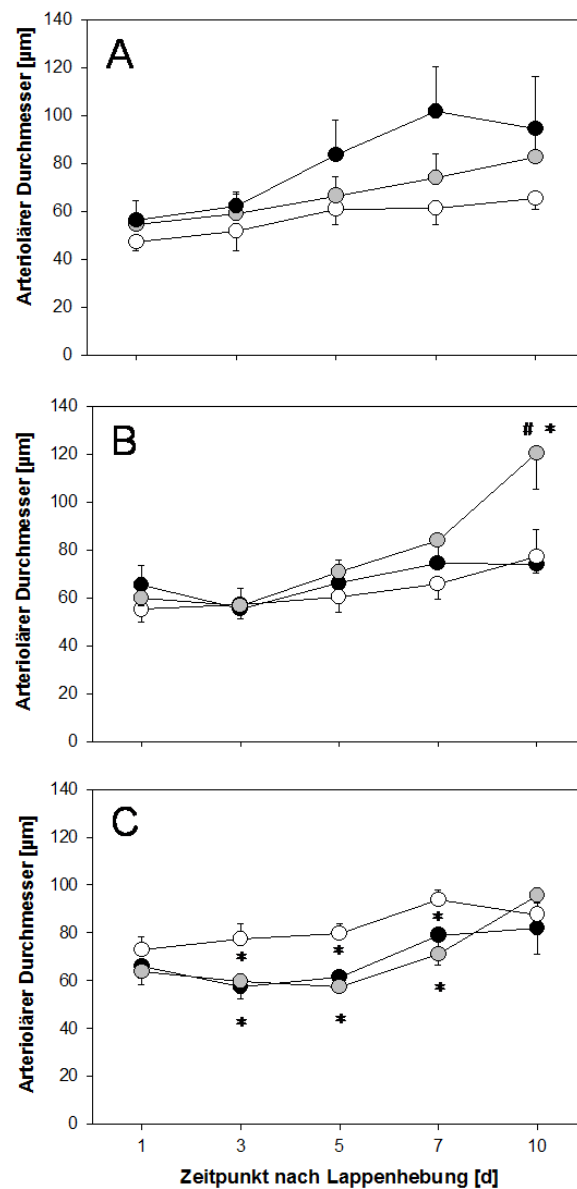


Abb. 6.2.2: Arteriolarer Durchmesser in µm nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert ± SEM, \*  $p < 0,05$  vs NaCl; #  $p < 0,05$  vs Trolox.

### 6.2.3 Arteriöläre Fließgeschwindigkeit

Über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen konnten in keinem der drei Lappenareale signifikante Unterschiede zwischen der aFG der Behandlungsgruppen festgestellt werden, auch nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe.

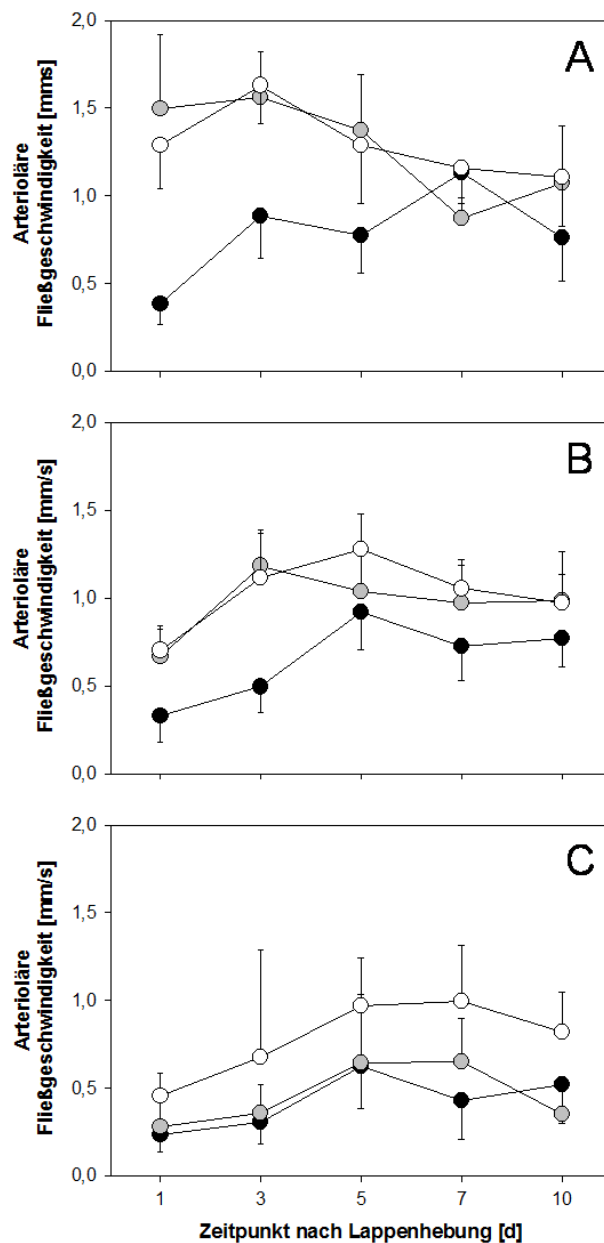


Abb. 6.2.3: Arteriöläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Interessanterweise zeigten die mit Trolox vorbehandelten Tiere in allen 3 Lappenarealen die geringste aFG. In Kontrolltieren beobachteten wir im kritisch perfundierten Anteil die höchste aFG (s. Abb. 6.2.3 A-C).

## 6.2.4 Arteriöler Blutfluss

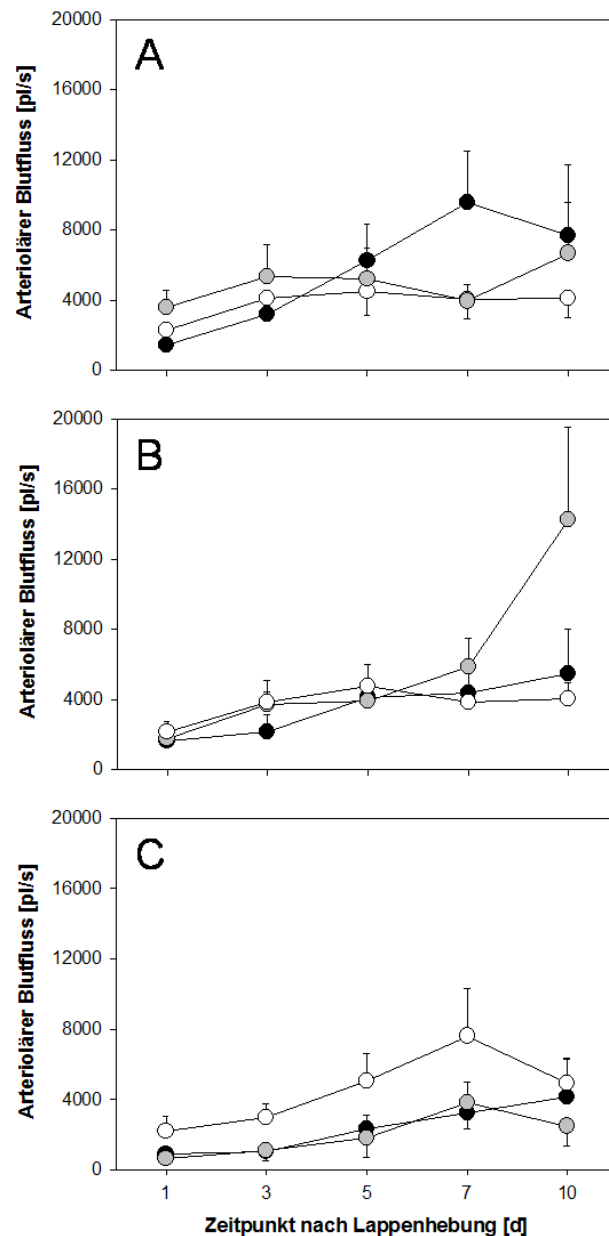


Abb. 6.2.4: Arteriöler Blutfluss in pl/s nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM.



Im adäquat perfundierten Lappenareal zeigten alle Versuchsgruppen einen eindeutigen Anstieg des aBF, ohne jedoch signifikante Unterschiede zu erreichen (s. Abb. 6.2.4 A).

Im zentralen Lappenareal konnte lediglich in der mit NAC behandelten Gruppe der Blutfluss über den Beobachtungszeitraum deutlich gesteigert werden, insbesondere am 10. Tag nach Lappenhebung. In der mit Trolox behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe blieb der aBF weitestgehend konstant, ohne signifikante Unterschiede aufzuweisen (s. Abb. 6.2.4 B).

Auch im kritisch durchbluteten distalen Lappenabschnitt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im aBF zwischen den untersuchten Gruppen. Interessanterweise konnte im gesamten Lappen in allen Versuchsgruppen der aBF aufrechterhalten werden (s. Abb. 6.2.4 C).

### **6.2.5 Venulärer Durchmesser**

Sowohl im proximalen als auch im zentralen und distalen Teil des muskulokutanen Lappens kam es über den Beobachtungszeitraum bei behandelten und unbehandelten Tieren zu einer leichten Zunahme der venösen Durchmesser. Es stellten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen heraus (s. Abb. 6.2.5 A-C).

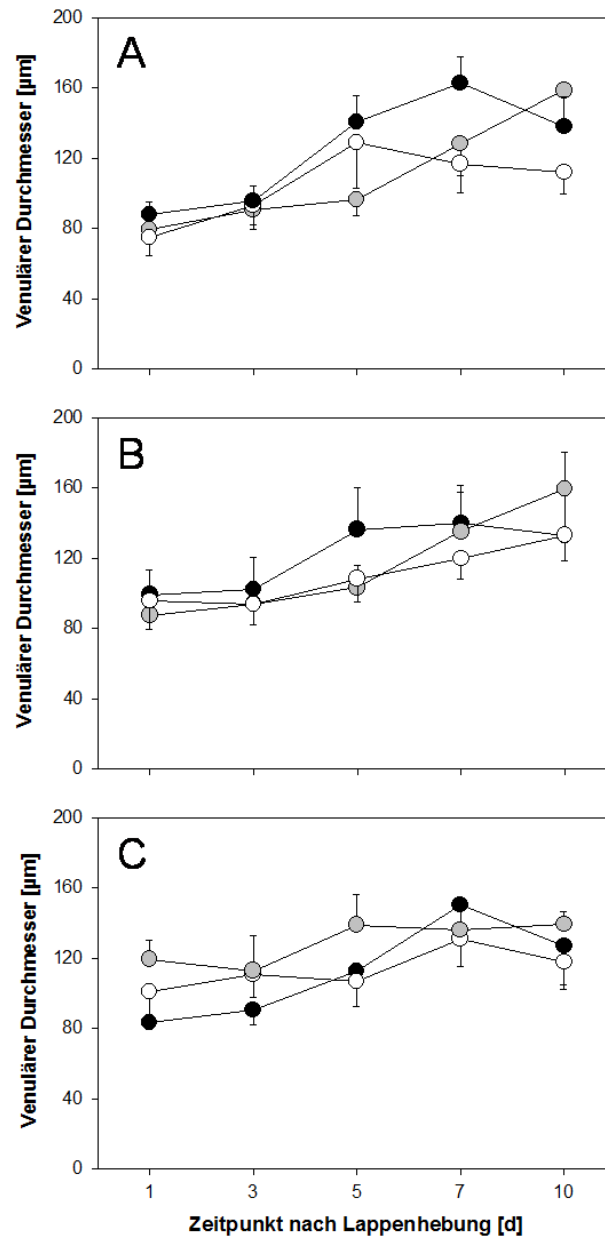


Abb. 6.2.5: Venulärer Durchmesser in µm nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 6.2.6 Venuläre Fließgeschwindigkeit

Im gut durchbluteten proximalen Lappenareal beobachteten wir in allen 3 Versuchsgruppen nicht signifikante, jedoch erhebliche Unterschiede der vFG, die nach vorübergehender Steigerung am 10. Tag wieder die Ausgangswerte erreicht hatten (s. Abb.6.2.6 A).

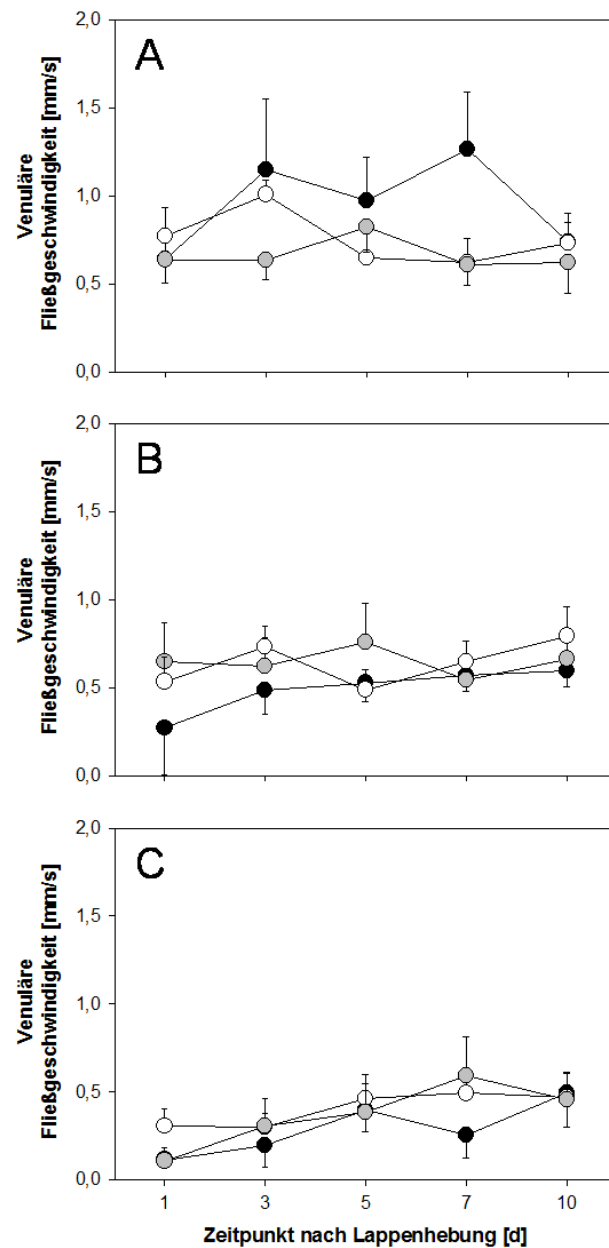


Abb. 6.2.6: Venuläre Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Das kritisch durchblutete Lappengewebe zentral zeigte mit dem proximalen Lappenareal vergleichbare Fließgeschwindigkeiten, wohingegen distal die aFG deutlich niedriger waren. (s. Abb. 6.2.6 B/C).

### 6.2.7 Venulärer Blutfluss (vBF)

Als Konsequenz der vDM und der vFG beobachteten wir in allen 3 Gruppen eine deutliche Zunahme des vBF.

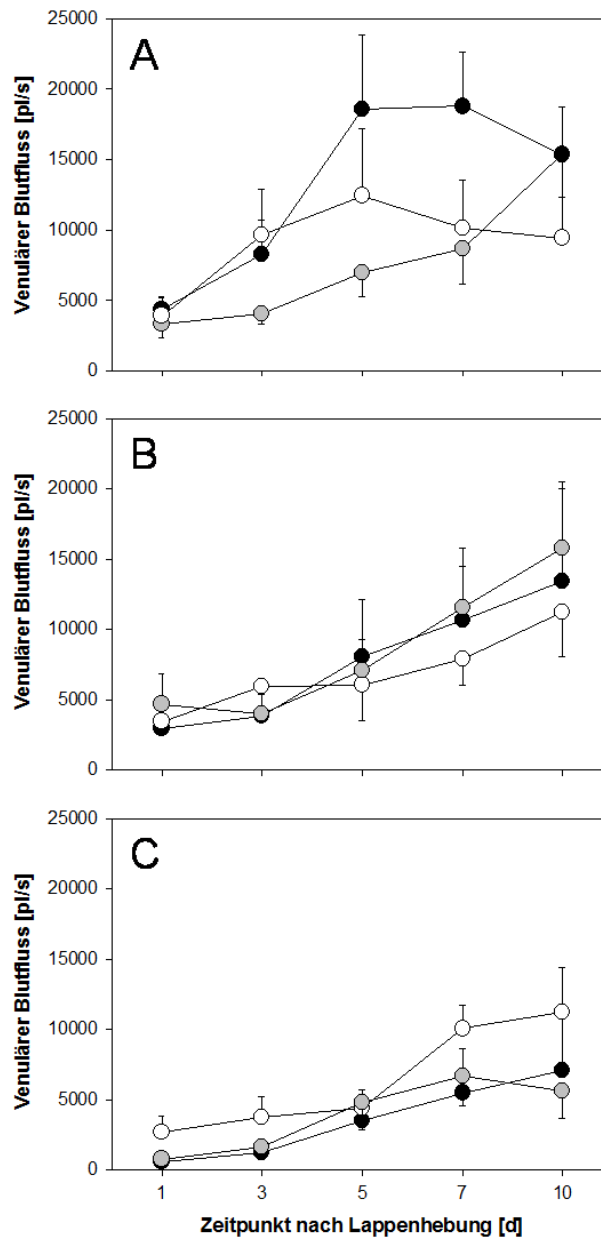


Abb. 6.2.7: Venulärer Blutfluss in pl/s nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Im adäquat perfundierten proximalen Lappenareal zeigten alle 3 Versuchsgruppen an

Tag 1 einen vergleichbaren vBF, ebenso an Tag 10 nach Lappenhebung. Lediglich die mit Trolox vorbehandelte Gruppe konnte den Blutfluss zwischen Tag 5 und 7 etwas stärker steigern als die beiden anderen Versuchsgruppen (s. Abb. 6.2.7 A).

Im kritisch durchbluteten zentralen Lappenareal war der vBF am Tag 10 in der NAC-Vorbehandlung um 30% höher als in den Kontrollen (s. Abb. 6.2.7 B).

Distal im Lappen zeigten alle 3 Versuchsgruppen einen erhaltenen vBF, der in den unbehandelten Kontrollen etwas höher war als in den vorbehandelten Versuchsgruppen (s. Abb. 6.2.7 C).

### **6.2.8 Kapillarer Durchmesser**

Im proximalen Lappenareal kam es über den 10-tägigen Beobachtungszeitraum in allen drei Gruppen zu einem leichten Anstieg der kapillaren Durchmesser, ohne nennenswerte Unterschiede zwischen den Gruppen aufzuweisen. Am 1. Tag nach Lappenhebung war der Durchmesser in den Kapillaren der mit NAC vorbehandelten Tiere jedoch signifikant größer als in der mit Trolox behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe (s. Abb. 6.2.8 A).

In den kritisch perfundierten zentralen und distalen Lappenarealen verhielten sich die Durchmesser ähnlich wie im proximalen Anteil, wobei die Ausgangswerte bei allen Gruppen praktisch identisch waren (s. Abb. 6.2.8 B/C). Über den Versuchszeitraum beobachteten wir in allen Gruppen eine Zunahme der Kapillardurchmesser. Es ist hervorzuheben, dass jeweils die Durchmesser der Troloxgruppe gegenüber den anderen Gruppen gering gradig erhöht waren.

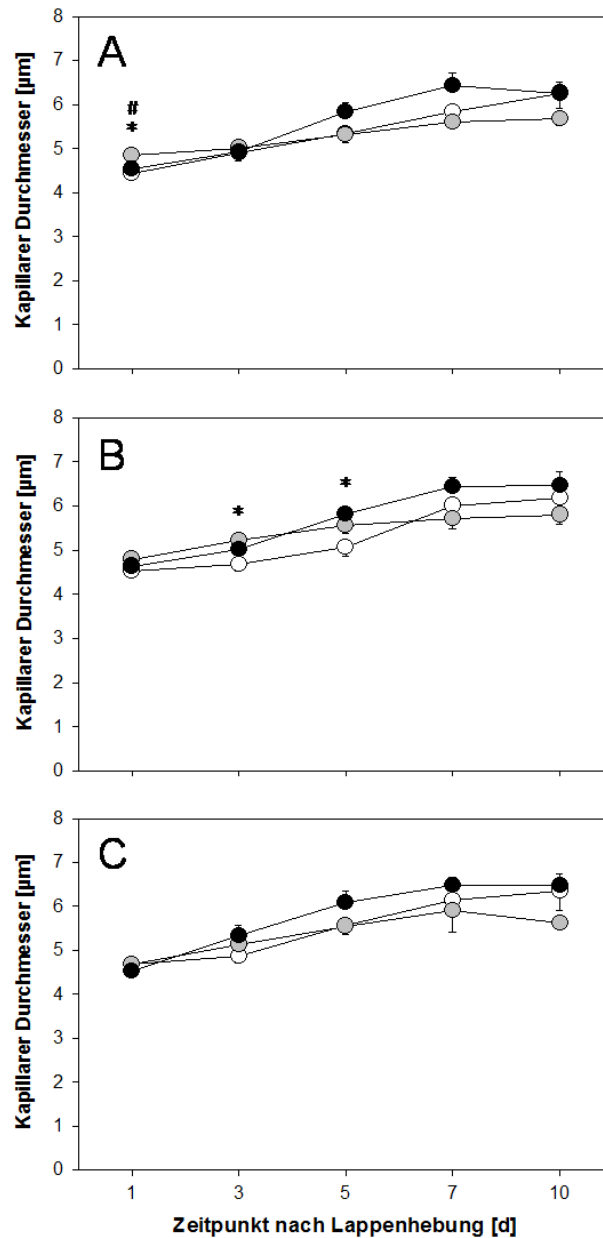


Abb. 6.2.8: Kapillarer Durchmesser in  $\mu\text{m}$  nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs NaCl; #  $p < 0,05$  vs Trolox.

### 6.2.9 Kapillare Fließgeschwindigkeit

Die kFG zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. Es ist jedoch anzumerken, dass sämtliche Kapillaren aller Versuchsgruppen über die gesamte Versuchsperiode perfundiert waren und dass insgesamt eine leichte Zunahme der kFG zu beobachten war (s. Abb. 6.2.9 A-C).

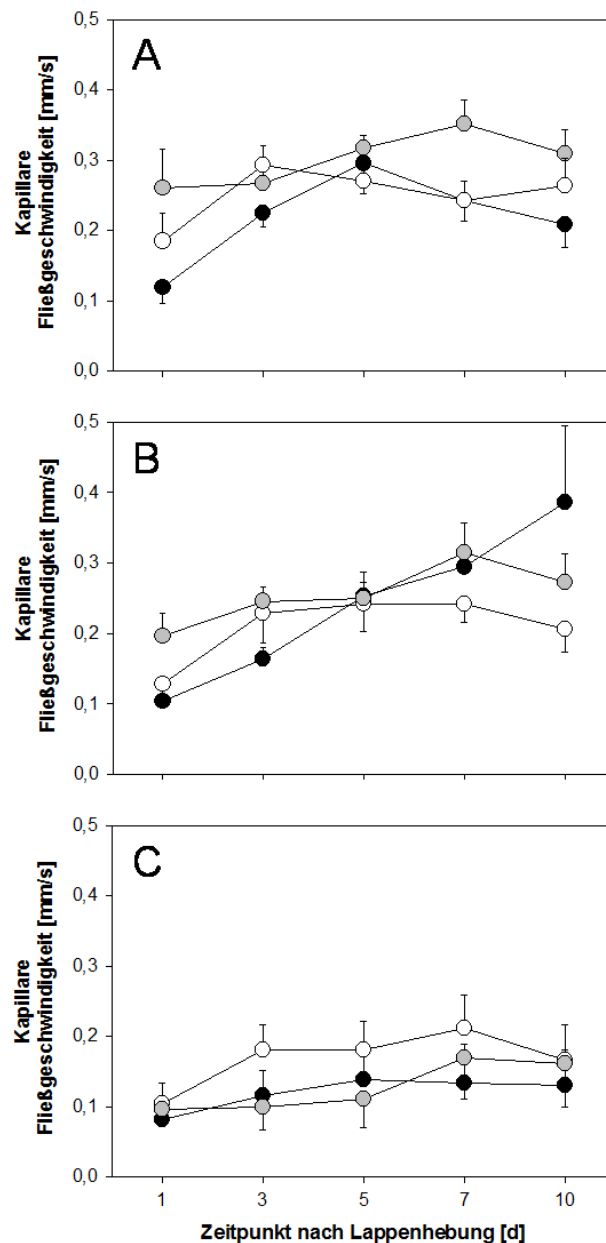


Abb. 6.2.9: Kapillare Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung und NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM.

## 6.2.10. Kapillarer Blutfluss

Im proximalen Lappenareal konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum insgesamt ein leichter Anstieg des kBF beobachtet werden, wobei der kBF der mit NAC behandelten Tiere die höchsten Werte aufzeigte (s. Abb. 6.2.10 A).

Im kritisch perfundierten zentralen Lappenareal kam es in den mit Trolox behandelten Tieren zu einem markanten Anstieg des kBF. Dagegen zeigten die mit NAC behandelten

Tiere und die unbehandelten Kontrolltiere nur einen geringen Anstieg des kBF über die 10 Tage, so dass am 10. Tag der Blutfluss in den mit Trolox behandelten Tieren deutlich höher war als in beiden anderen Gruppen (s. Abb. 6.2.10 B).

Im distalen Lappenareal zeigten sämtliche Tiere nur einen geringgradigen Anstieg des kBF, der gegenüber proximal und zentral geringer ausfiel (s. Abb. 6.2.10 C).

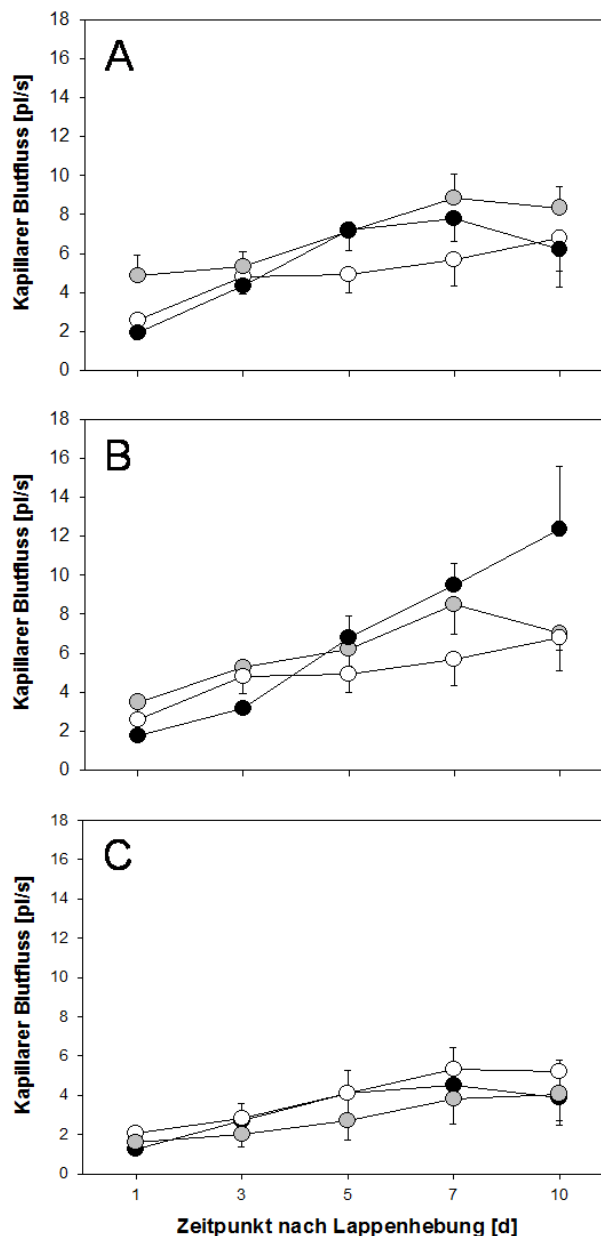


Abb. 6.2.10: Kapillarer Blutfluss in pl/s nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM.



### 6.2.11 Funktionelle Kapillardichte (FKD)

Sowohl im proximalen als auch im zentralen Lappenabschnitt beobachteten wir in der NAC-Gruppe bereits am 1. Tag nach Lappenhebung eine erhaltene FKD, die über die weiteren 10 Tage um lediglich 10 % abnahm ( $\sim 230 \text{ cm/cm}^2$  an Tag 1 vs  $\sim 200 \text{ cm/cm}^2$  an Tag 10;  $p < 0,05$  vs Kontrolle).

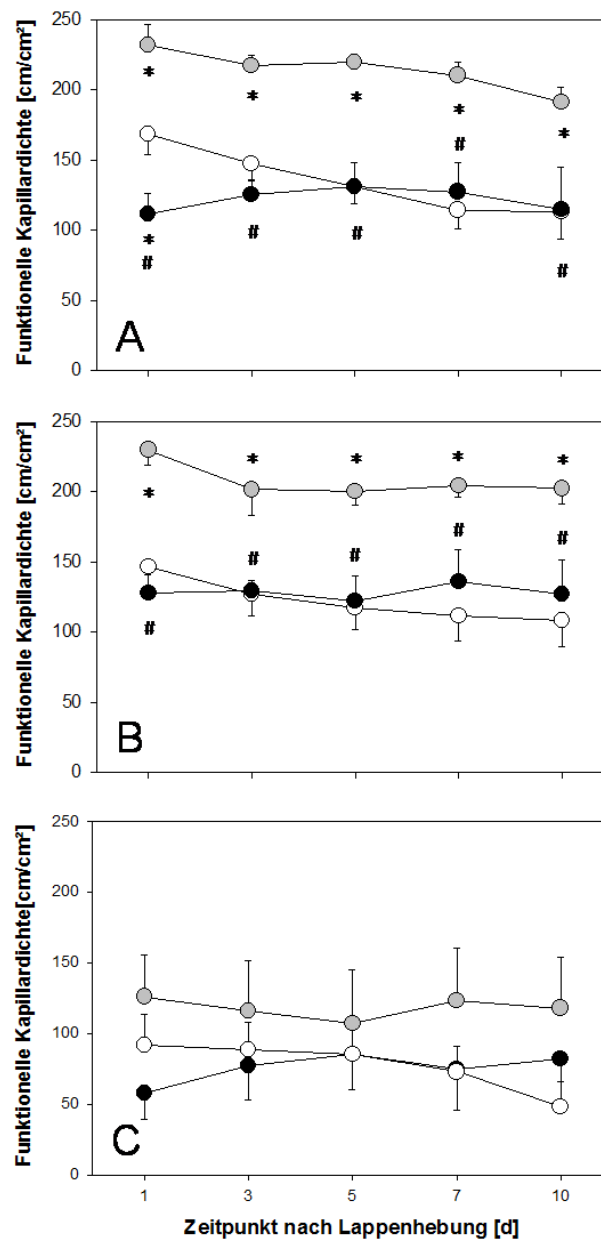


Abb. 6.2.11: Funktionelle Kapillardichte in  $\text{cm/cm}^2$  nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs NaCl; #  $p < 0,05$  vs Kontrolle.

Sowohl die Kontrolltiere wie auch die mit Trolox vorbehandelten Tiere ( $p < 0,05$  vs NAC) zeigten in den gleichen Lappenarealen eine konstante um 50% reduzierte Kapillarperfusion, im Vergleich zu NAC-Vorbehandlung (s. Abb.6.2.11 A/B).

Im distalen Areal beobachteten wir in den mit NAC vorbehandelten Tieren eine relativ gut erhaltene FKD, die derjenigen der Kontrollen und mit Trolox vorbehandelten Tieren im proximalen und zentralen Lappenareal entsprach. Interessanterweise konnten wir in den Kontrolltieren und in den mit Trolox vorbehandelten Tieren eine mäßig erhaltene FKD beobachten, die jedoch gegenüber der NAC-Vorbehandlung deutlich reduziert war (s. Abb. 6.2.11 C).

### **6.2.12 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (rollende Leukozyten)**

Die unbehandelten Kontrolltiere im proximalen Lappenareal zeigten nach chirurgischem Eingriff eine Ischämie-induzierte Entzündung, die mit einem signifikanten Anstieg der „rollenden Leukozyten“ einherging. Diese klang über die 10 Tage um circa 35% ab. Die Verabreichung von NAC und Trolox führte zu einer signifikanten Verminderung der inflammatorischen Antwort, was durch Abnahme der rollenden Leukozyten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gekennzeichnet war. Die Zahl der Leukozyten blieb in beiden behandelten Gruppen über den versuchszeitraum weitestgehend konstant (s. Abb. 6.2.12 A).

Sowohl im zentralen als auch im distalen Lappenareal beobachteten wir im Vergleich zum proximalen Areal ein vergleichbares Verhalten der Leukozyten nach Ischämieinduktion durch Lappenhebung (s. Abb.6.2.12 B/C). Allerdings war die Anzahl rollender Leukozyten in unbehandelten Kontrollen weniger ausgeprägt im Vergleich zum proximalen Drittel. Da nach Vorbehandlung mit Trolox und NAC die Anzahl der Leukozyten in allen 3 Lappenarealen vergleichbar war, ist die Vorbehandlung offensichtlich unabhängig vom Ischämiegrad des entsprechenden Lappenareals wirksam.

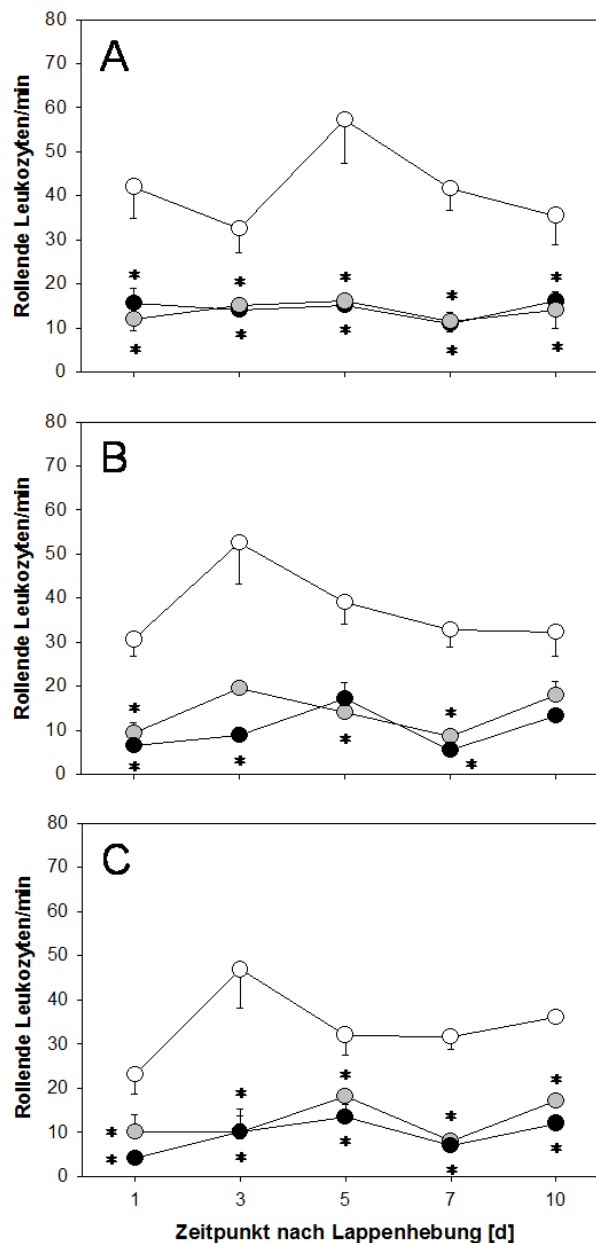


Abb. 6.2.12: Rollende Leukozyten in n/min Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs NaCl.

### 6.2.13 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (adhärente Leukozyten)

In den unbehandelten Kontrolltieren induzierte die Ischämie im proximalen Lappenareal ebenfalls eine Entzündungsreaktion in Form eines Anstiegs der adhärenen Leukozyten, die jedoch nicht so stark ausgeprägt war wie der Anstieg der rollenden Leukozyten in diesem Lappenareal. Im proximalen Lappenareal konnten die adhärenen Leukozyten in beiden behandelten Gruppen auf markante Weise gesenkt werden. Die

Vorbehandlung mit Trolox und NAC bewirkte hier über den gesamten Versuchszeitraum eine signifikant reduzierte Entzündungsreaktion, ohne dabei jedoch Unterschiede zwischen den Vorbehandlungen zu zeigen (s. Abb. 6.2.13 A).

Im zentralen und distalen Lappenareal beobachteten wir ein vergleichbares Verhalten der adhärenen Leukozyten. Allerdings war die Entzündungsreaktion in den Kontrollen geringer (s. Abb. 6.2.13 B/C).

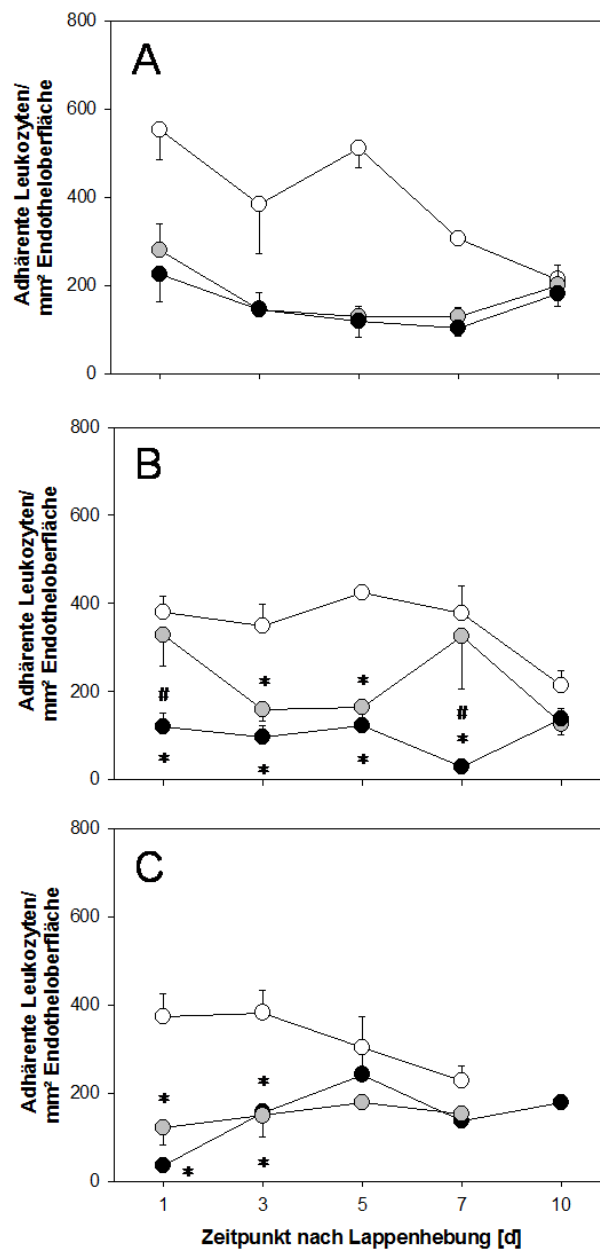


Abb. 6.2.13: Adhärenente Leukozyten in n/mm<sup>2</sup> Endotheloberfläche nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* p<0,05 vs NaCl.

### 6.2.14 Apoptotische Zellen

Der apoptotische Zelltod war über die 5 Beobachtungstage in allen 3 Lappenarealen in unbehandelten Kontrollen signifikant erhöht. Eine Reduktion der zellulären Apoptose beobachteten wir ab dem 1. Tag nach Lappenhebung in allen 3 Lappenarealen, wobei diese nach Vorbehandlung mit Trolox und NAC besonders in den kritisch perfundierten zentralen und distalen Lappenarealen ausgeprägt war (s. Abb.6.2.14 A-C).

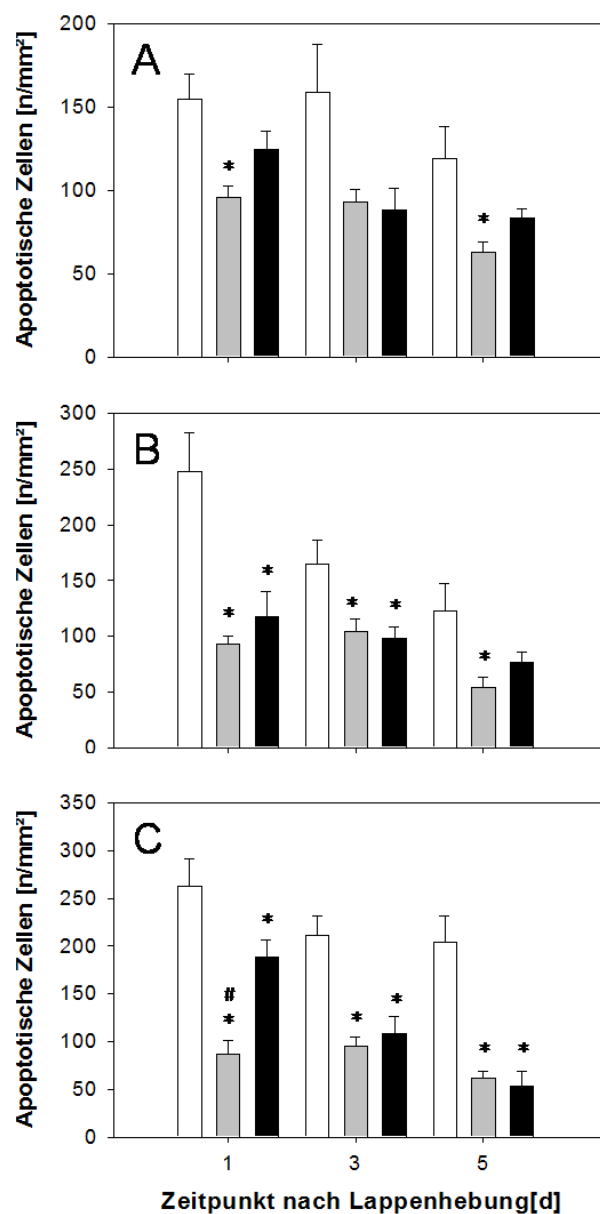


Abb. 6.2.14: Apoptotische Zellen in n/mm<sup>2</sup> nach Trolox (schwarze Kreise) bzw. N-Acetylcystein (graue Kreise) Vorbehandlung oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenareal. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* p<0,05 vs NaCl; # p<0,05 vs Trolox.

## 6.3 Antiinflammatorische Substanzen

### 6.3.1 Nekrotische Gewebefläche

In der Kontrollgruppe bewirkte die Lappenhebung am 1. Tag nach Präparation einen Perfusionsausfall von circa 40% der Gesamtlappenfläche. Die anhaltende Ischämie führte schließlich zu einer Nekrose von circa 45% am 10. Tag nach Lappenhebung. In der mit NS 398 vorbehandelten Gruppe fiel der initiale Perfusionsausfall mit circa 48% bereits deutlich höher aus als in der Kontrollgruppe. Interessanterweise beobachteten wir über den 10 - täglichen Versuchszeitraum hier eine kontinuierliche Verminderung des Perfusionsausfalls, die am 10. Tag lediglich noch bei 38% der Gesamtlappenfläche lag (s. Abb. 6.3.1).

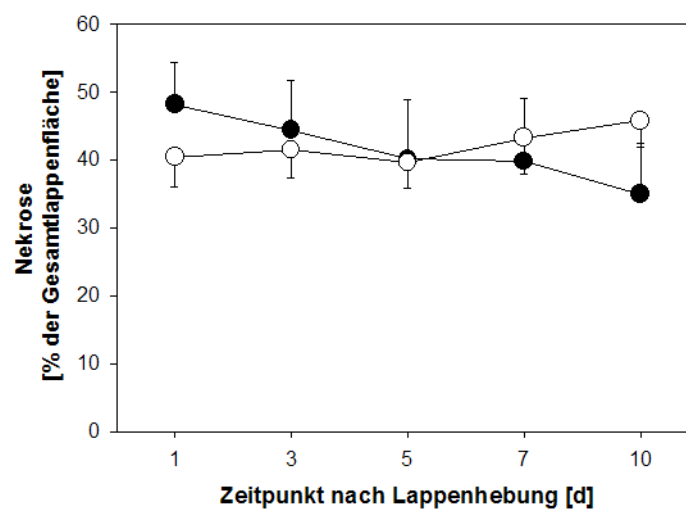


Abb. 6.3.1: Nekrose in % der Gesamtgewebefläche nach NS 398-Vorbehandlung (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung. Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 6.3.2 Arteriöler Durchmesser

Im proximalen und zentralen Lappenareal nahmen die Durchmesser der Arteriolen in sämtlichen untersuchten Gruppen über den Versuchszeitraum leicht zu, ohne dabei jedoch signifikante Unterschiede untereinander zu erreichen (s. Abb. 6.3.2 A/B).

Im distalen Lappenareal kam es in den Arteriolen der Kontrolltiere zu einer deutlichen Dilatation über den Beobachtungszeitraum, wohingegen die Durchmesser in den mit NS 398 vorbehandelten Tieren über die 10 Tage nahezu konstant blieben, so dass diese hier insbesondere zwischen dem 5. und 10. Tag nach Lappenhebung signifikant geringer als diejenigen der Kontrollgruppe waren (s. Abb. 6.3.2 C).

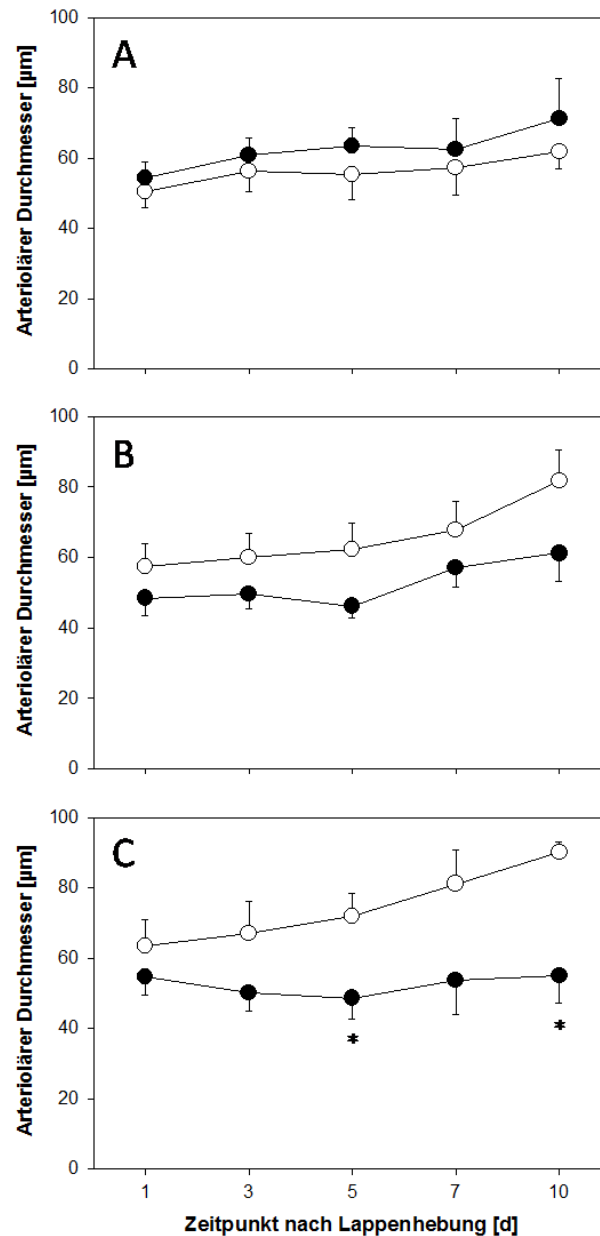


Abb. 6.3.2: Arteriöler Durchmesser in  $\mu\text{m}$  nach NS 398-Vorbehandlung- (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs NaCl.

### 6.3.3 Arteriöle Fließgeschwindigkeit

In allen drei Lappenarealen war in beiden untersuchten Gruppen über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen eine deutliche Steigerung der aFG zu beobachten. Eine Ausnahme bildete lediglich die Kontrollgruppe im proximalen Lappenareal. Hier lag die aFG am 10. Tag nach Lappenhebung leicht unter der initialen aFG. Hervorzuheben ist, dass die aFG der Kontrollgruppe stets signifikant höher war als in den mit NS 398 vorbehandelten Tieren (s. Abb. 6.3.3 A-C).

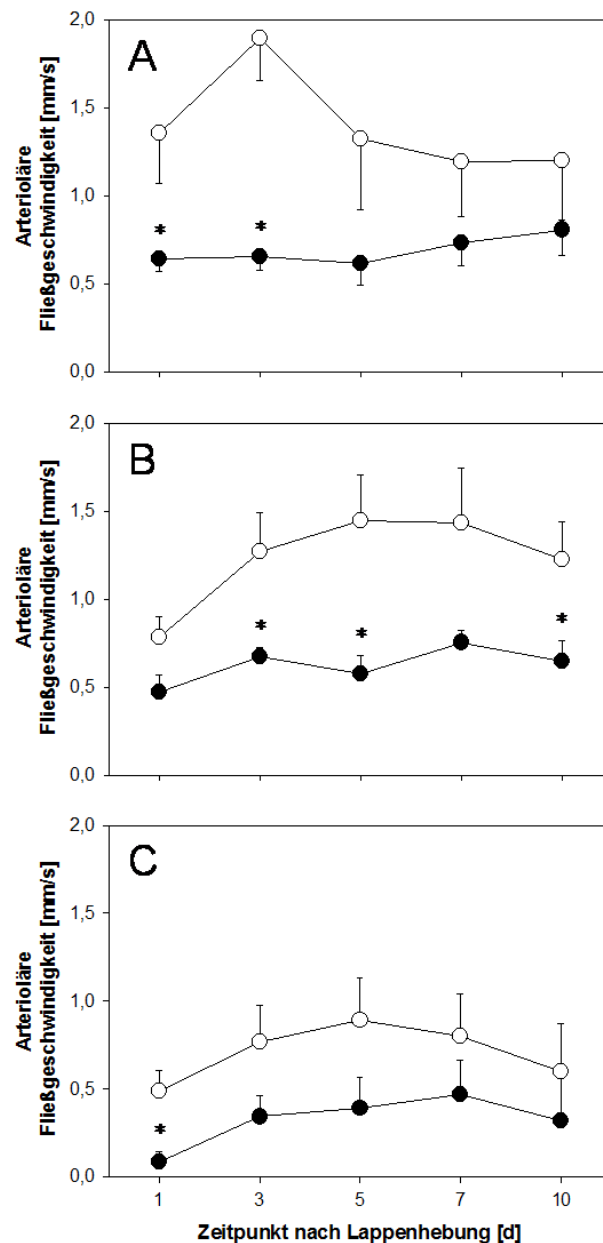


Abb. 6.3.3: Arteriöläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit in mm/s nach NS 398-Vorbehandlung- (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs NaCl.

#### 6.3.4 Arteriölärer Blutfluss

Sowohl im adäquat durchbluteten proximalen als auch in den kritisch durchbluteten zentralen und distalen Lappenarealen war über den Versuchszeitraum in allen untersuchten Tieren eine deutliche Steigerung des aBF zu beobachten. Auffällig war, dass analog zu der aFG auch der aBF in den Kontrolltieren stets signifikant höher war als der aBF in den mit NS 398 vorbehandelten Tieren. Insbesondere im zentralen Lappenareal kam es in den



Kontrolltieren zu einem drastischen Anstieg des aBF, wohingegen die mit NS 398 vorbehandelten Tiere den aBF nur leicht steigern konnten (s. Abb. 6.3.4 A-C).

Hervorzuheben ist jedoch, dass in allen 3 Lappenarealen trotz chronischer Ischämie ein zumindest marginaler aBF aufrechterhalten werden konnte.

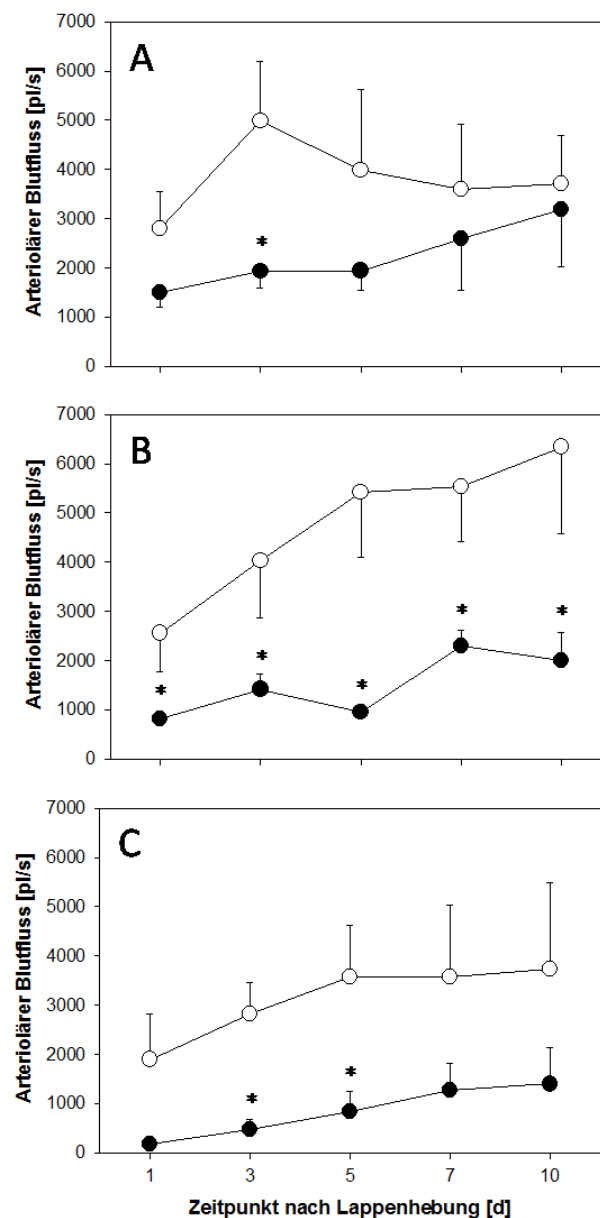


Abb. 6.3.4: Arteriolarer Blutfluss in pl/s nach NS 398-Vorbehandlung- (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs NaCl.

### 6.3.5 Venulärer Durchmesser

In allen 3 Lappenarealen fand sich eine Steigerung der venulären Durchmesser über den gesamten Beobachtungszeitraum von 10 Tagen, ohne dass dabei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auffällig waren. Interessanterweise war die dilatatorische Antwort in den mit NS 398 vorbehandelten Tieren im adäquat durchbluteten proximalen Lappenareal am stärksten ausgeprägt (Tag 10) (s. Abb. 6.3.5 A-C).

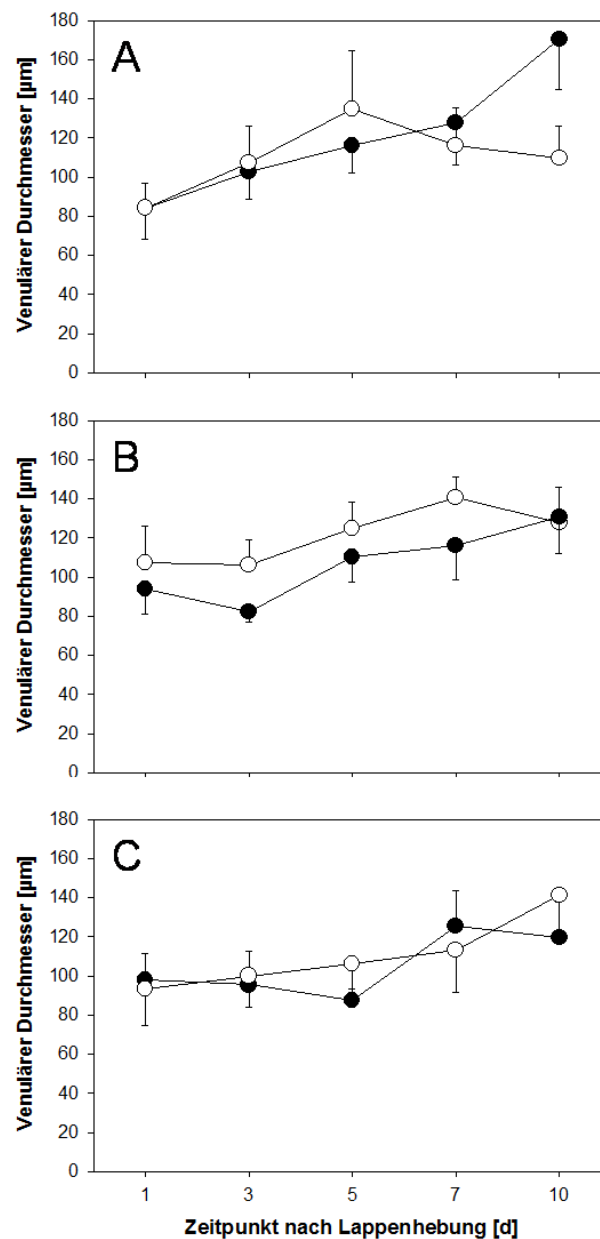


Abb. 6.3.5: Venulärer Durchmesser in µm nach NS 398-Vorbehandlung (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 6.3.6 Venuläre Fließgeschwindigkeit

In allen drei Lappenarealen führte die Lappenhebung sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der mit NS 398 vorbehandelten Gruppe nur zu einem minimalen Anstieg der vFG über den Beobachtungszeitraum. Obwohl die Fließgeschwindigkeit in der Kontrollgruppe konstant auf etwas höherem Niveau aufrechterhalten werden konnte als in der NS 398-vorbehandelten Gruppe, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (s. Abb. 6.3.6 A-C).

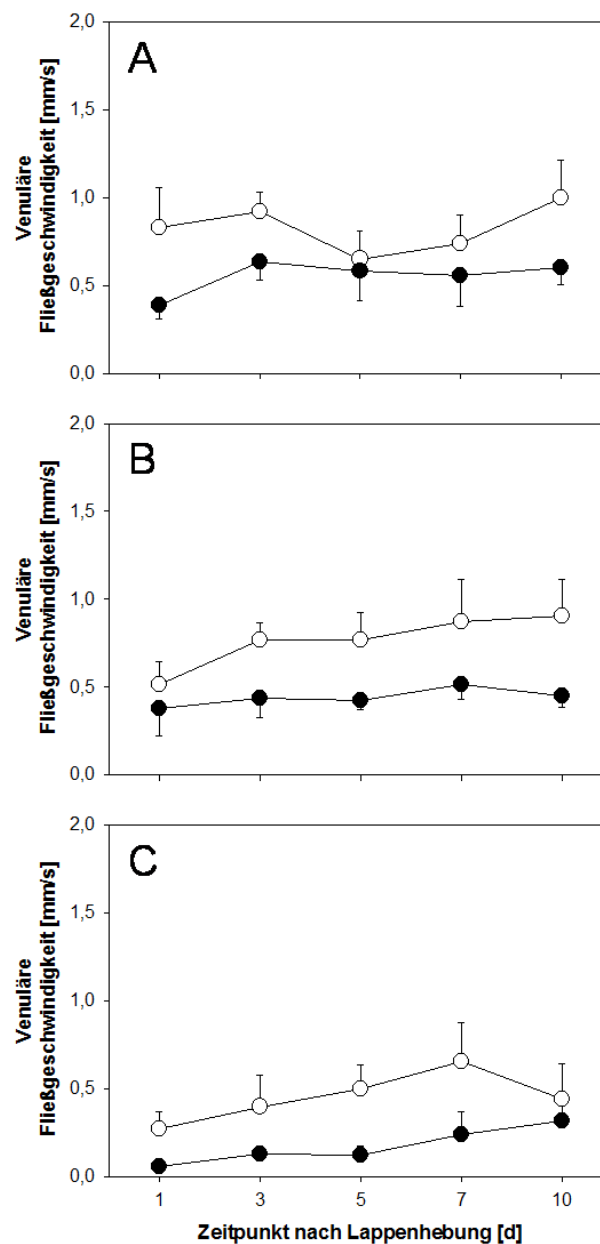


Abb. 6.3.6: Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit in mm/s nach NS 398-Vorbehandlung (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A) , zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 6.3.7 Venulärer Blutfluss

Tendenziell kam es nach Lappenhebung in allen drei Lappenarealen in beiden Versuchsgruppen zu einer deutlichen Zunahme des vBF über den Versuchszeitraum von 10 Tagen.

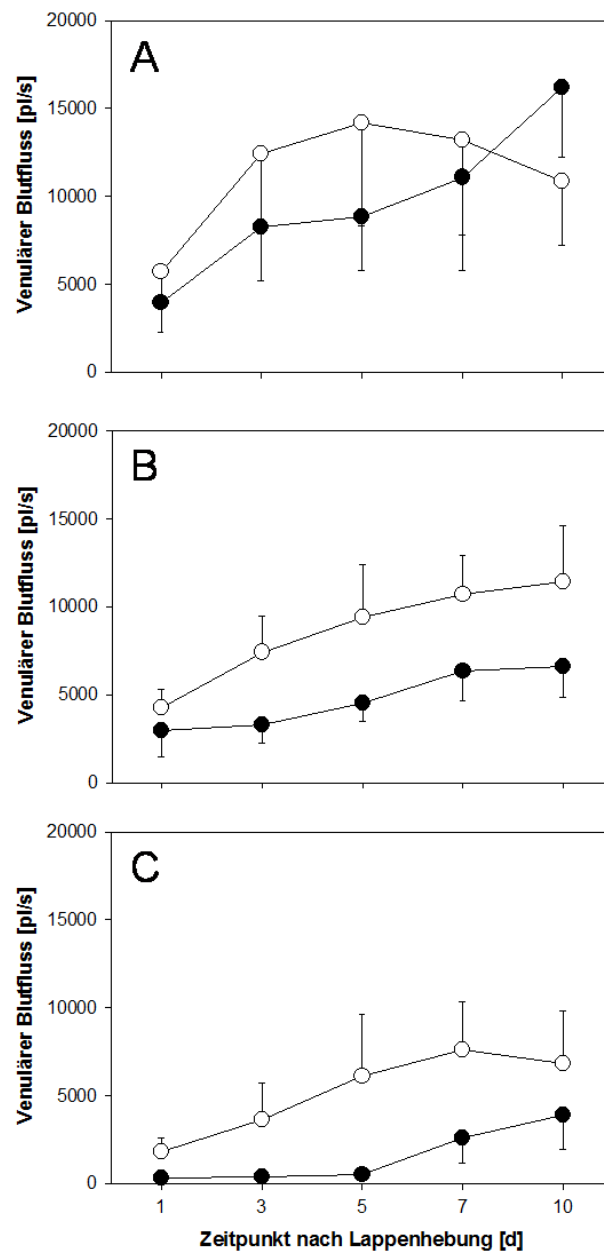


Abb. 6.3.7: Venulärer Blutfluss in pl/s nach NS 398-Vorbehandlung (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Interessanterweise konnte in den Kontrolltieren in allen 3 Lappenarealen ein adäquater Blutfluss aufrechterhalten werden, während die mit NS 398 vorbehandelten Tiere nur im proximalen Lappenareal eine drastische Zunahme des vBF erreichen konnten (s. Abb. 6.3.7 A).

Im kritisch durchbluteten zentralen Lappenareal konnte bei gleichen Ausgangswerten durch die NS 398-Vorbehandlung nur noch eine leichte Steigerung des vBF im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden (s. Abb. 6.3.7 B).

Im distalen Lappenareal war in der Behandlungsgruppe nur noch ein marginaler vBF vorhanden (s. Abb. 6.3.7 C).

### 6.3.8 Kapillarer Durchmesser

In allen 3 Lappenarealen fand sich in sämtlichen untersuchten Tieren eine Zunahme der kapillaren Durchmesser, ohne dass dabei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erreicht wurden (s. Abb. 6.3.8 A-C).

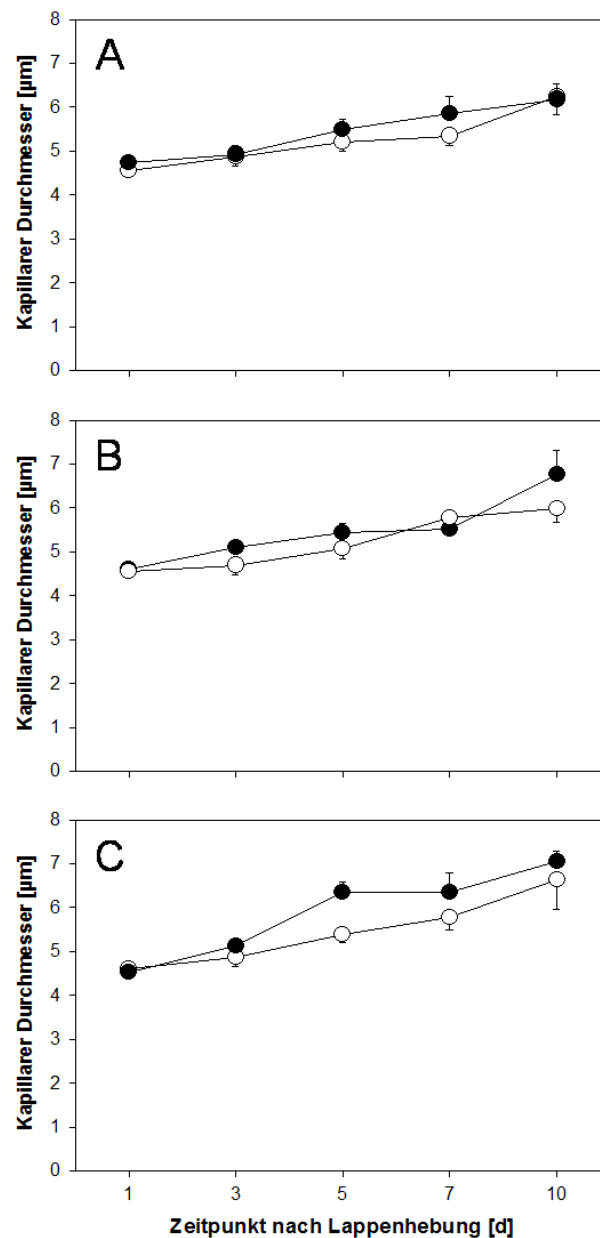


Abb. 6.3.8: Kapillarer Durchmesser in µm nach NS 398-Vorbehandlung (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 6.3.9 Kapillare Fließgeschwindigkeit (kFG)

Im gut durchbluteten proximalen und kritisch durchbluteten zentralen Lappenareal nahm die kFG über die Versuchsperiode konstant zu. Dabei wiesen die Kontrollgruppe und die NS 398 vorbehandelte Gruppe nahezu identische Werte auf (s. Abb. 6.3.9 A/B).

Im marginal durchbluteten distalen Lappenareal konnte die kFG in der Kontrollgruppe auf deutlich, jedoch nicht signifikant höherem Niveau im Vergleich zur NS 398 vorbehandelten Gruppe aufrecht erhalten werden (s. Abb. 6.3.9 C).

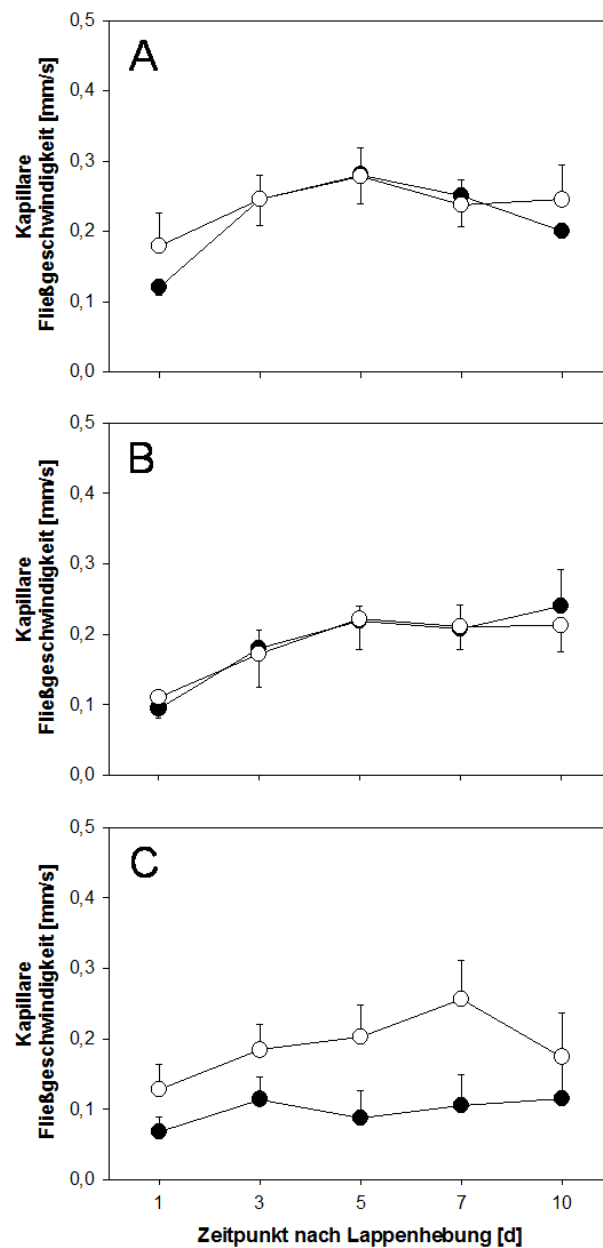


Abb. 6.3.9: Kapillare Fließgeschwindigkeit in mm/s nach NS 398-Vorbehandlung (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7, und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 6.3.10 Kapillarer Blutfluss

Im proximalen und zentralen Lappenareal führte die Lappenhebung über den Versuchszeitraum in sämtlichen Tieren zu einer drastischen Zunahme des kBF, ohne dabei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu zeigen (s. Abb. 6.3.10 A/B).

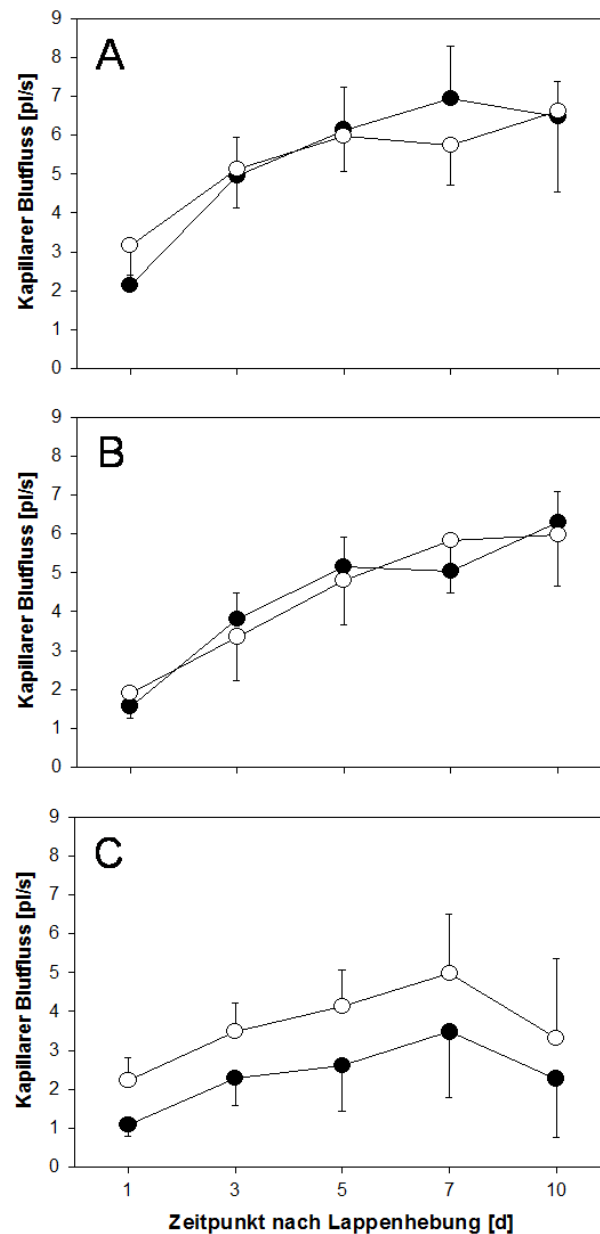


Abb. 6.3.10: Kapillarer Blutfluss in pl/s nach NS 398-Vorbehandlung (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM.



Im distalen Lappenareal war die Zunahme des kBF über den Versuchszeitraum nicht ganz so stark ausgeprägt. Auch wenn hier der kBF in der Kontrollgruppe tendenziell etwas höher war als in den mit NS 398 vorbehandelten Tieren, so ist doch hervorzuheben, dass in allen Lappenarealen zumindest ein geringer Blutfluss aufrechterhalten werden konnte (s. Abb. 6.3.10 C)

### **6.3.11 Funktionelle Kapillardichte**

Im proximalen Lappenareal konnte in den mit NS 398 behandelten Tieren die nutritive Perfusion über den gesamten Beobachtungszeitraum auf hohem Niveau aufrechterhalten werden, wohingegen es in den Kontrolltieren rasch zu einem starken Abfall der FKD kam. Aus dieser Entwicklung resultierten hoch signifikante Unterschiede zwischen Behandlungsgruppe und Kontrollgruppe, die bis zum 10. Tag des Versuches erhalten blieben (s. Abb. 6.3.11 A).

Im zentralen Lappenareal konnte die nutritive Perfusion in den behandelten Tieren ebenfalls auf hohem Ausgangsniveau erhalten werden. Da die Werte nicht ganz so hoch lagen wie im proximalen Lappenareal und aufgrund der Tatsache, dass der Abfall der FKD in der Kontrollgruppe sich hier nicht ganz so deutlich vollzog, waren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erst am 7. und 10. Tag zu beobachten (s. Abb. 6.3.11 B).

Im distalen Areal war in beiden untersuchten Gruppen ein nutritives Perfusionsversagen zu beobachten. Die von Beginn des Versuches an niedrige FKD nahm über den Beobachtungszeitraum in beiden Gruppen noch weiter ab. Signifikante Unterschiede zwischen behandelten und Kontrolltieren konnten nicht festgestellt werden (s. Abb. 6.3.11 C).

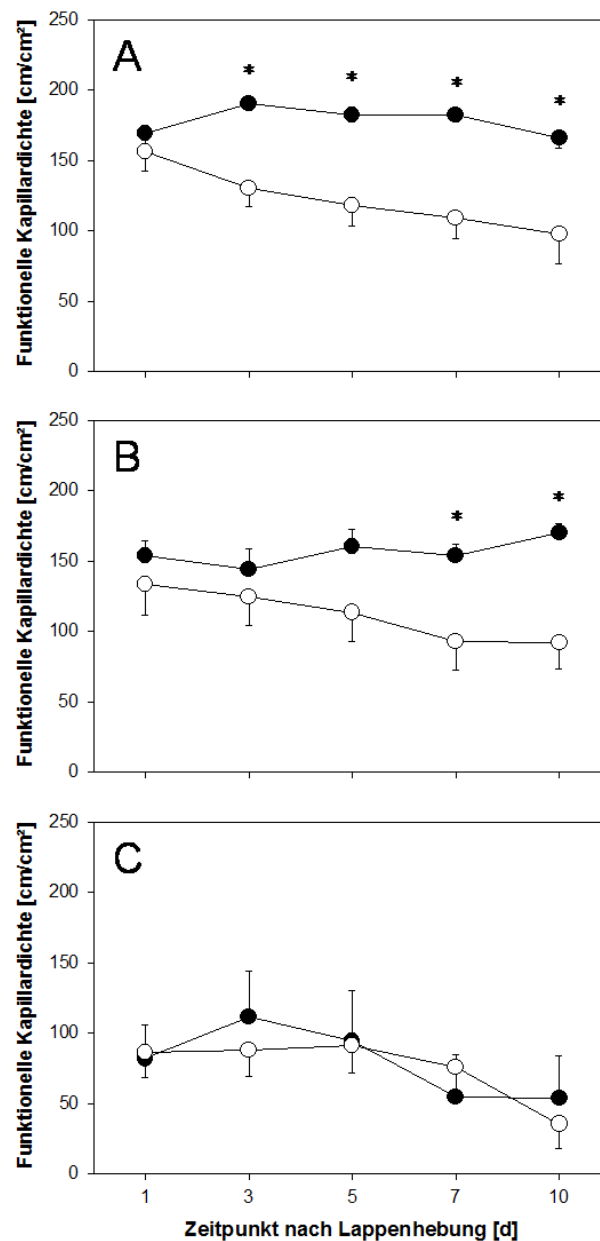


Abb. 6.3.11: Funktionelle Kapillardichte in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  nach NS 398-Vorbehandlung (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7, und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs NaCl.

### 6.3.12 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (rollende Leukozyten)

Im proximalen Lappenareal konnten die Leukozyten in der Kontrollgruppe von einer am Anfang des Beobachtungszeitraumes hohen Zahl auf ein deutlich niedrigeres Niveau am Ende des Versuches reduziert werden. In der Behandlungsgruppe fanden sich schon zu Beginn des Versuches eindeutig niedrigere Leukozytenzahlen, welche bis zum 10. Tag des Versuches weiter abnahmen. Die Behandlung führte also zu einer deutlichen, am 3. und 5.

Tag nach Lappenhebung signifikanten Reduktion der rollenden Leukozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 6.3.12 A).

Im zentralen Areal kam es trotz leichter Schwankungen insgesamt in beiden Gruppen nur zu einer leichten Abnahme der rollenden Leukozyten über den Beobachtungszeitraum. Ursache dafür war die Tatsache, dass die Leukozyten schon von Beginn des Versuches an hier niedriger waren als im proximalen Areal. Nur am 3. Tag nach Lappenhebung waren die Leukozyten in der Behandlungsgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. An den übrigen Tagen konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (s. Abb. 6.3.12 B).

Im distalen Lappenareal entwickelten sich die beiden untersuchten Gruppen zunächst gegenläufig. Während die Lappenhebung in der behandelten Gruppe eine starke Abnahme der rollenden Leukozyten bis zum 5. Tag des Versuches bewirkte, kam es gleichzeitig zu einer Steigerung dieses Entzündungsparameters in der Kontrollgruppe. Ab dem 5. Tag kehrte sich diese Entwicklung allerdings ins Gegenteil um, so dass sich die Gruppen am 10. Tag des Versuches auf dem gleichen Niveau befanden, welches dem Ausgangswert der Kontrollgruppe entsprach. Signifikante Unterschiede konnten trotz der deutlichen Abweichung der Gruppen nicht festgestellt werden (s. Abb. 6.3.12 C).

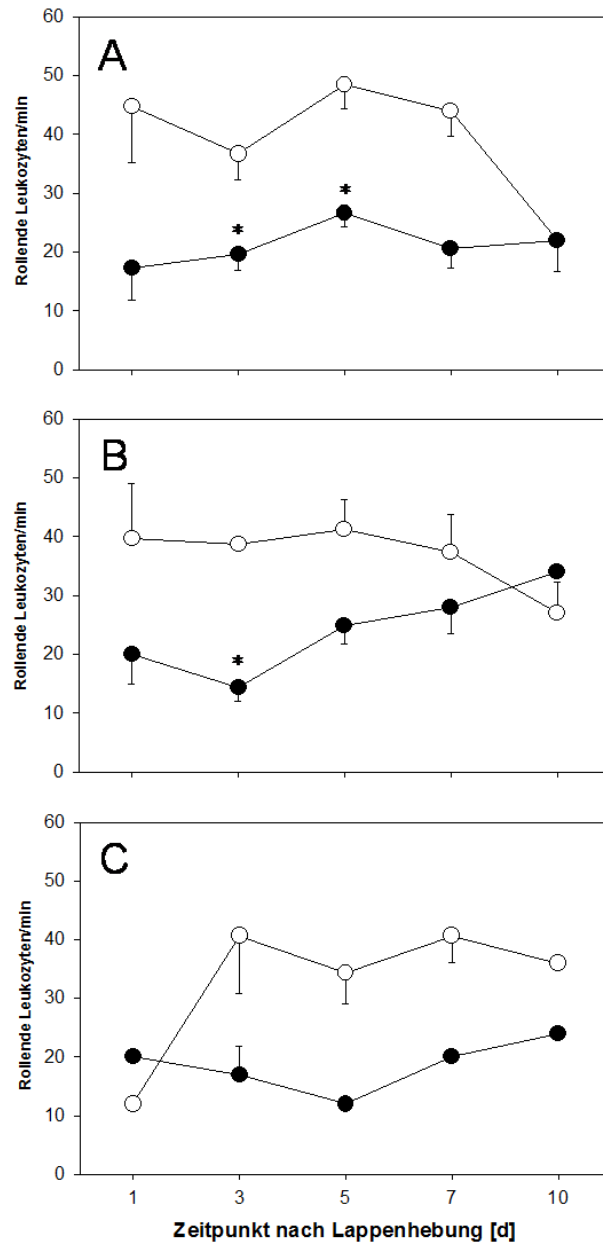


Abb. 6.3.12: Rollende Leukozyten in n/min Endotheloberfläche nach NS 398-Vorbehandlung (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7, und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs NaCl.

### 6.3.13 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (adhärente Leukozyten)

Aufgrund mangelnder Bildqualität durch das starke Gewebeödem konnte dieser Parameter am 10. und letzten Tag des Versuches nicht mehr ausgewertet werden.

Im proximalen Lappenareal blieb die Zahl der adhärenenten Leukozyten in beiden Gruppen bis zum 3. Tag des Versuches konstant. Während daraufhin in der Kontrollgruppe die Zahl der adhärenenten Entzündungszellen zunahm, reduzierten sich die Leukozyten in der

behandelten Gruppe deutlich, was am 5. Tag zu signifikant niedrigen Leukozytenzahlen in der behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Am 7. Tag des Versuches waren die Leukozytenzahlen in beiden Gruppen wieder nahezu gleich, allerdings niedriger als zu Beginn des Versuchs (s. Abb.6.3.13 A).

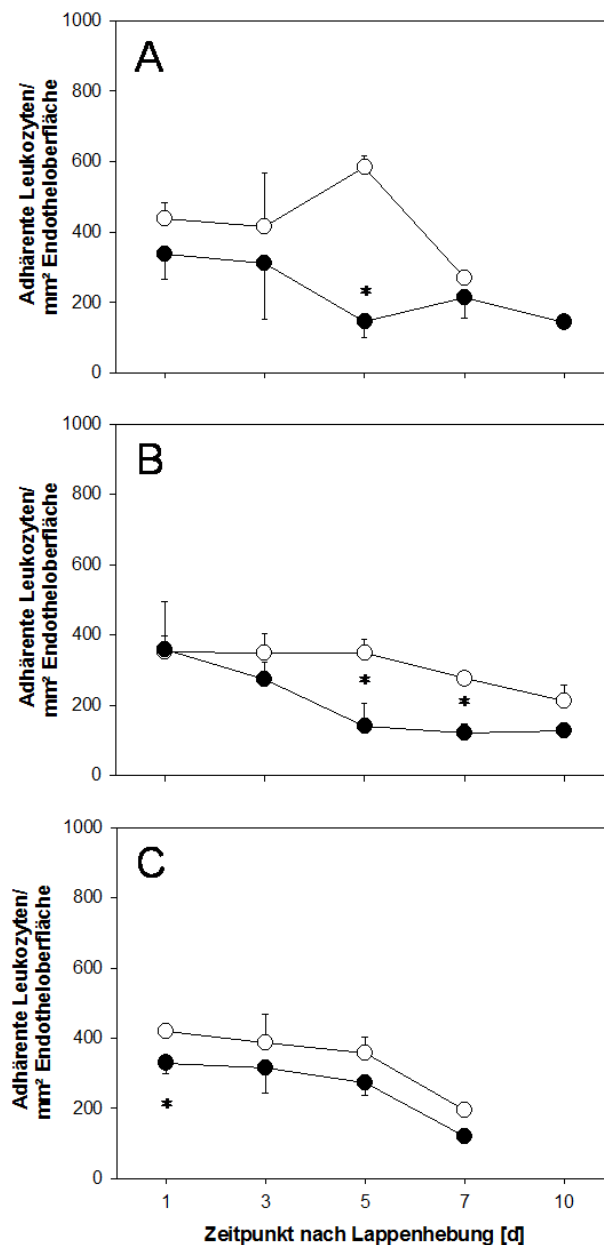


Abb. 6.3.13: Adhärenz Leukozyten in n/mm² Endotheloberfläche nach NS 398-Vorbehandlung (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs NaCl.

Im zentralen Lappenareal blieben die adhärenenten Leukozyten in den unbehandelten Kontrolltieren bis zum 5. Tag des Versuchs unverändert, wohingegen sich die Zahl der Leukozyten in den behandelten Tieren von gleichem Niveau ausgehend bis zum 7. Tag deutlich reduzierte, was in signifikant niedrigeren Werten in der mit NS 398-behandelten Gruppe resultierte (s. Abb. 6.3.13 B).

Im distalen Lappenareal reduzierte sich die Zahl der adhärenenten Leukozyten über den Beobachtungszeitraum in beiden Gruppen leicht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ergab sich dabei nur am 1. Tag nach Lappenhebung (s. Abb. 6.3.13 C).

### **6.3.14 Apoptotische Zellen**

Im proximalen Lappenareal war die Zahl der apoptotischen Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten in der behandelten Gruppe deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war am 1. Tag nach Lappenhebung signifikant. Insgesamt nahmen die apoptotischen Zellen in beiden Gruppen über den Beobachtungszeitraum leicht ab (s. Abb. 6.3.14 A).

Im zentralen Lappenareal nahmen die apoptotischen Zellen über den Versuchszeitraum ebenfalls in beiden Gruppen ab. Am 1. und 5. Tag nach Lappenhebung wies die behandelte Gruppe signifikant weniger apoptotische Zellen auf als die Kontrollgruppe (s. Abb. 6.3.14 B).

Im distalen Lappenareal war der apoptotische Zelltod in der behandelten Gruppe an allen ausgewerteten Tagen signifikant geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Insgesamt nahmen die apoptotischen Zellen in beiden untersuchten Gruppen über den Versuchszeitraum leicht ab (s. Abb. 6.3.14 C).

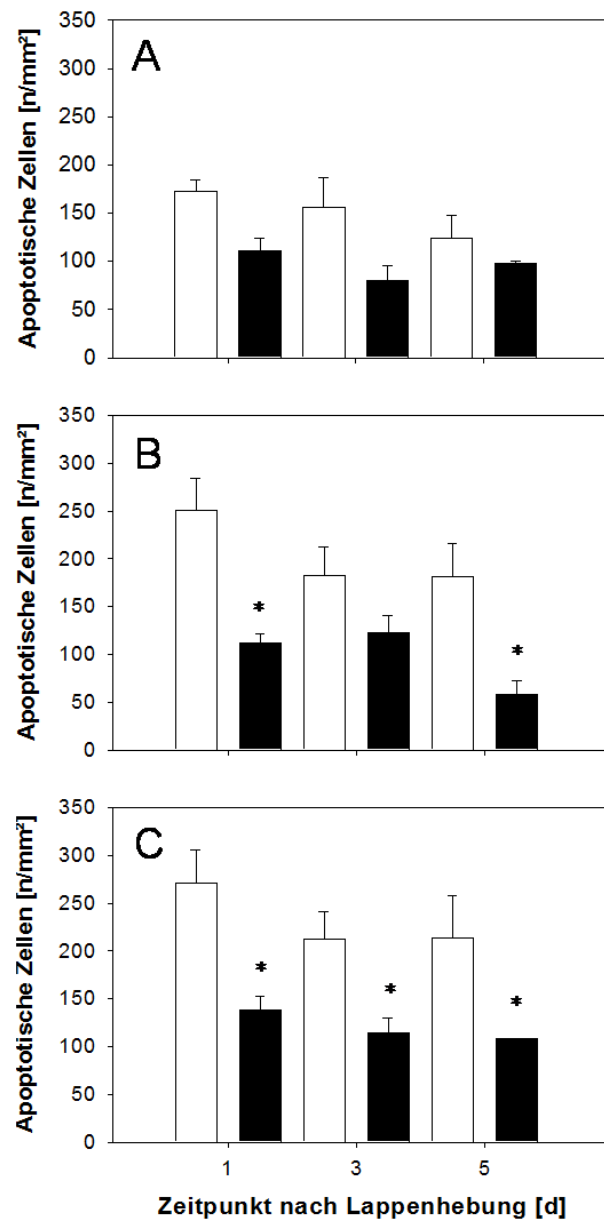


Abb. 6.3.14: Apoptotische Zellen in n/mm<sup>2</sup> nach NS 398-Vorbehandlung (schwarze Kreise) oder NaCl-Kontrollbehandlung (weiße Kreise) 1, 3, 5, 7, und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs NaCl.

## 7. Diskussion

### 7.1 Diskussion des Modells und der Methoden

Seit vielen Jahren werden Kammermodelle, implantiert in Mäuse [Algire GH 1943], Hamster [Greenblatt M, Shubik P 1967], Ratten und sogar Menschen [Aspegren and Breine 1964], von zahlreichen Arbeitsgruppen zur Beobachtung der Mikrozirkulation mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie in Granulationsgewebe, Hauttransplantaten und anderen Geweben verwendet. Um den Zugang zu diesen Kammern zu erleichtern, wurden sie in die Rückenhaut der Tiere implantiert [Cardon, Oestermeyer et al. 1970], [Endrich, Asaishi et al. 1980], [Papenfuss, Gross et al. 1979]. Mit Hilfe dieser Modelle wurden Studien zur Erforschung autochthoner Mikrozirkulation sowie des Wachstums und der Mikrostruktur in neoplastischen [Papenfuss, Gross et al. 1979], [Oda, Lehmann et al. 1984] und nicht-neoplastischen Geweben [Funk, Endrich et al. 1986], [Menger, Jager et al. 1990] durchgeführt. 1993 integrierte erstmals eine Forschungsgruppe die quergestreifte Muskulatur der Rückenhaut von Nacktmäusen in die Rückenhautkammer. Über einen Zeitraum von 2 Wochen wurden mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern, die einerseits Plasma und andererseits Leukozyten anfärbten, mikrohämodynamische Parameter wie Gefäßdurchmesser und Fließgeschwindigkeit von Erythrozyten in Arteriolen und Venulen und in Kapillaren sowie die funktionelle Kapillardichte und die Zahl und das Verhalten von Leukozyten in diesen Gefäßen beobachtet [Lehr, Leunig et al. 1993].

In der hier durchgeführten Studie wurde das von Lehr etablierte Modell der Rückenhautkammer, modifiziert nach Harder et al. [2004], verwendet. So wurden zwei bekannte Modelle, nämlich, das etablierte Rückenhautkammermodell der Maus [Menger, Laschke et al. 2002] und ein modifizierter lateral gestielter Hautlappen auf dem Rücken der Maus [Galla, Saetzler et al. 1991] kombiniert. Resultat war die Integration des gestielten Hautlappens inklusive des Musculus Panniculus carnosus in die Rückenhautkammer [Harder, Amon et al. 2004]. Mit Hilfe dieser Modifikation entstand in der Kammer eine chronische Ischämie, die es erlaubte, die Mikrozirkulation im Zustand einer realistischen klinischen Situation zu beobachten und durch die Gabe von Medikamenten mögliche therapeutische Optionen zur Reduktion der Nekrose in gestielten Lappenplastiken zu finden.

Der entscheidende Vorteil dieses Modells ist, dass im Gegensatz zu den meisten anderen Modellen, die die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Visualisierung der



Mikrozirkulation z.B. im Gewebe des Mesenteriums [Han et al. 2009], des Herzens [Dong et al. 2009], der Leber [Liu et al. 2009] des Muskels [Szczesny, Nolte et al. 2000] und osteomyokutaner Lappen [Rucker, Roesken et al. 1999] verwenden, hier nicht nur eine akute, d.h. über einige Stunden dauernde, sondern eine chronische über mehrere Tage andauernde Beobachtung der Mikrogefäßstruktur und ihrer Veränderung über die Zeit möglich ist. Durch die Beobachtung der Gefäße über 10 Tage war es möglich, bestimmte Gefäße am ersten Beobachtungstag zu definieren und so eine sehr genaue Analyse über deren Entwicklung im Verlauf der chronischen Ischämie über 10 Tage zu erhalten.

Das Breite-Länge-Verhältnis des Lappens (15x11mm) wurde so gewählt, dass sich die Nekrose in unbehandelten Kontrolltieren mit nur geringer Abweichung in den verschiedenen Tieren ( $49\pm 3\%$ ) stets auf circa 50% der Lappenfläche ausbreitete. Dies ermöglichte es die unterschiedlichsten Substanzen zu testen und stets unter standardisierten Bedingungen untereinander und mit den entsprechenden unbehandelten Kontrolltieren zu vergleichen. Aufgrund des Weichteiltraumas zeigen einige Kapillaren allerdings erst nach einer gewissen Latenzzeit wieder Perfusion, genannt „capillary recruitment“ [Amon, Laschke et al. 2006], so dass sich die Ausprägung der Nekrose im Zeitverlauf noch leicht verändern kann. Zusätzlich simuliert dieses Modell die klinische Situation der Präparation randomisiert durchbluteter Lappenplastiken in der rekonstruktiven Chirurgie ziemlich genau, da das Lappenüberleben nach wie vor durch ischämiebedingte Komplikationen wie Wundheilungsstörungen und partiellen oder vollständigen Lappenverlust [Duff, Aslam et al. 2003], [van Uchelen, Werker et al. 2001] gefährdet ist.

Um eine möglichst gute Bildqualität in der Auswertung der mikrozirkulatorischen Parameter zu erreichen, fand die erste intravitalmikroskopische Untersuchung erst 24 Stunden nach Präparation der Rückenhautkammer statt. Unmittelbar nach Präparation entsteht durch das Weichteiltrauma ein Gewebeödem, das die Bildqualität im Intravitalmikroskop entscheidend negativ beeinflusst. 24 Stunden nach Präparation hat sich dieses Gewebeödem weitestgehend erholt.

Alle applizierten Medikamente konnten intraperitoneal, bzw. subkutan injiziert werden und trotzdem eine systemische Wirkung erreichen. Dies ist ein großer Vorteil im Gegensatz zu einer beispielsweise direkten Injektion in den Lappenstiel, da diese zum einen ein zusätzliches Weichteiltrauma induziert hätte und zum anderen durch die Manipulation am Lappen selbst die dortige Mikrozirkulation negativ hätte beeinflussen können. Außerdem wäre auf diese Weise eine vorzeitige Applikation der untersuchten Substanzen im Sinne einer Präkonditionierung nicht möglich gewesen. Genau dies war aber in dieser Studie gewünscht, da die Lappenpräparation in der plastischen Chirurgie hauptsächlich einen geplanten, elektiven Eingriff darstellt. So konnte bereits gezeigt werden, dass beispielsweise

die intraperitoneale Injektion von Erythropoietin 24 Stunden vor Lappenhebung die Nekrose im Lappen und die gesamte Mikrozirkulation signifikant verbessern konnte. Hier konnte sogar die Neubildung von Gefäßsprossen beobachtet werden [Rezaeian, Wettstein et al. 2008]. Eine intravenöse Injektion hätte einerseits einen weitaus größeren Aufwand für den Operateur, andererseits einen großen Stress für die Versuchstiere bedeutet.

Als Versuchstiere wurden Mäuse verwendet, da diese Tiere genetisch sehr gut definiert sind. Dies würde ermöglichen, in fortführenden Studien ein breites Spektrum von Antikörpern direkt gegen individuelle Moleküle, z.B. der Cytokinfamilie oder Zelladhäsionsrezeptoren, einzusetzen. Auch die Verwendung von speziellen Knockout-Mäusen wäre so möglich. Über die hier verwendete C57BL/6-Maus ist bekannt, dass sie zum einen als Hintergrundstamm für Knockout-Mäuse dient, zum anderen aufgrund ihrer festen Hautstruktur besser geeignet ist als Nacktmäuse oder Balb/C Mäuse, die Rückenhautkammer über die 10 Tage zu tragen.

## **7.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **7.2.1 Nicht körpereigene Antioxidantien**

In diesem Studienabschnitt konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit den beiden exogenen Antioxidantien, N-Acetylcystein und Trolox, die durch die Lappenhebung induzierte Gewebeentzündung über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, signifikant reduzieren konnte. Da beide Vorbehandlungen gleichermaßen eine Reduktion der Gewebeeinflammation, nicht aber der Nekrose, induzieren konnten, ist die Ausprägung der Entzündung wohl nicht die Determinante für das Ausmaß der Nekrose. Das gleiche gilt für den in beiden Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierten apoptotischen Zelltod. Das erstaunliche in dieser Studie ist, dass die NAC-Vorbehandlung zusätzlich über den Versuchszeitraum eine deutliche arterioläre Dilatation erzielen konnte, die im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu der mit Trolox vorbehandelten Gruppe signifikant höher war. Ebenso konnte hier die FKD auf hohem Niveau aufrechterhalten werden, was schließlich zu einem signifikant besseren Lappenüberleben in der NAC-Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen führte. Daher muss wohl die arterioläre Dilatation mit Aufrechterhaltung der FKD als Mechanismus für die Reduktion der Nekrose gesehen werden.

Bereits in zahlreichen experimentellen und klinischen Studien konnten die protektiven

antioxidativen Eigenschaften von NAC und Trolox gezeigt werden. NAC war in einem Modell an Ratten in der Lage die distale Nekrose in einem randomisiert durchbluteten Lappen im Gegensatz zu einer Kontrollbehandlung mit NaCl signifikant zu reduzieren [Abla, Gomes et al. 2005]. Aber auch in Studien, die keine Hautlappenmodelle benutzten, war die Gabe von NAC erfolgreich. So konnte in einer Ischämie-Reperfusionstudie bewiesen werden, dass die Gabe von Glutathion, das durch NAC aktiviert wird, die Nekroserate in Hepatozyten nach Ischämie-Reperfusion um circa 50% reduziert werden konnte. Ebenso konnte hier nach Glutathion-Verabreichung der Blutfluss in Sinusoiden im Vergleich zu einer mit NaCl behandelten Kontrollgruppe nahezu vollständig erhalten werden. Gleichzeitig fand eine Reduktion der leukozytären Antwort in Sinusoiden und postsinusoidalen Venulen statt [Schauer, Gerbes et al. 2004]. Des Weiteren zeigte die hochdosierte Verabreichung von NAC durch seine Fähigkeit, die Glutathion-Level in Lungenalveolen zu steigern und somit dort antioxidativ zu wirken, positive Effekte in der Behandlung der fibrosierenden Alveolitis [Behr, Maier et al. 1997]. In einer Studie an Hunden war NAC in der Lage, den Reperfusionsschaden nach schwerer Hypothermie und völligem Stillstand der Mikrozirkulation unter anderem durch die Reduktion der dadurch entstehenden Entzündungsreaktion signifikant zu mindern [Cakir, Oruc et al. 2004]. Ebenso konnte die Behandlung mit NAC und Deferoxamine den Hirnschaden bei Ratten nach Sepsis durch die Herunterregulierung der CK positiv beeinflussen [Cassol et al. 2009] und in einem Modell an Leber und Lunge von Balb/C Mäusen den Ischämie-Reperfusionsschaden reduzieren [Zeng et al. 2009].

Es werden 2 verschiedene Theorien über den Wirkmechanismus von NAC diskutiert. NAC weist direkte und indirekte antioxidative Eigenschaften auf. Zum einen konnte gezeigt werden, dass NAC eine freie Thiol-Gruppe besitzt, die in der Lage ist, mit den elektrophilen Gruppen der bei der Entzündung entstehenden ROS zu reagieren und diese so zu neutralisieren [Moldeus, Cotgreave et al. 1986], [Aruoma, Halliwell et al. 1989]. Hierbei wird kurzfristig NAC-Thiol als Zwischenprodukt und schließlich NAC-Disulphid als Hauptendprodukt gebildet [Cotgreave 1997]. Andererseits zeigt NAC auch indirekte antioxidative Eigenschaften, da es als Vorläuferprodukt und Aktivator von Glutathion eine Rolle spielt. Glutathion entsteht unter anderem aus L-Cystein, dessen Sulfhydrylgruppe interne und externe toxische Agentien, so auch ROS, neutralisieren kann. Die Wirkung von NAC im Gegensatz zu anderen Cystein Derivaten ist dadurch zu erklären, dass NAC als einziges die Sulfhydrylgruppe besitzt, die essentiell für die Neutralisierung der ROS ist.

Abgesehen von den antioxidativen Eigenschaften ist NAC auch für seine antiapoptotischen Eigenschaften bekannt. So wurde gezeigt, dass NAC in Ratten mit COPD die Apoptose der Alveolarzellen verhindern kann [Cai, Chen et al. 2009]. Ebenso war NAC in

der Lage, den durch 2-Hydroxyethyl-Methacrylat induzierten apoptotischen Zelltod zu reduzieren [Paranjpe, Cacalano et al. 2009]. NAC wirkt, dadurch, dass es eine freie Thiol-Gruppe besitzt, nicht nur als Radikalfänger, es ist auch in der Lage, als Signalmolekül zu agieren und so direkt auf molekularer Ebene das Zellüberleben zu beeinflussen. Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass NAC das Überleben verschiedener Zelltypen begünstigt, indem es den „retrovirus associated sequence/extracellular-regulated kinase signaling pathway“ aktiviert [Yan and Greene 1998],[Li, Dehnade et al. 2000] und so die Expression spezifischer Gene induziert [Yan, Ferrari et al. 1995]. Auf diese Weise kann NAC die DNA-Bindungsaktivität einiger Transkriptionsfaktoren hochregulieren, unter anderem aktiviertes Protein 1 [Abate, Patel et al. 1990], den Transkriptionsfaktor NFkB [Anderson, Staal et al. 1994] und NF-aktivierte T-Zellen [Furuke, Shiraishi et al. 1999]. Über diese ist bereits bekannt, dass sie die Expression von Genen regulieren, die der Bcl-Familie bzw. den Apoptoseinhibitoren angehören [Tamatani, Che et al. 1999], [Wang, Mayo et al. 1998]. In einer weiterführenden in vitro-Studie an primären B-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass die Verhinderung der Apoptose dieser Zellen durch NAC damit zusammenhängt, dass NAC den durch Caspase-3 und -7 aktivierten proteolytischen Prozess inhibiert [Rosati, Sabatini et al. 2004]. Diese Erkenntnisse passen also sehr gut zu den in unserer Studie erhobenen Ergebnissen einer signifikanten Reduktion des apoptotischen Zelltods in NAC vorbehandelten Tieren.

Das signifikant bessere Lappenüberleben in den mit NAC vorbehandelten Tieren im Vergleich zu mit Trolox vorbehandelten Tieren und Kontrolltieren kann allerdings nicht alleine dadurch erklärt werden, dass die leukozytäre Entzündungsantwort und der apoptotische Zelltod in diesen Tieren deutlich geringer ausgeprägt war als in Kontrolltieren. In mit Trolox vorbehandelten Tieren konnte die leukozytäre Entzündungsantwort und der apoptotische Zelltod in vergleichbarer Weise gesenkt werden, jedoch ohne dabei das Lappenüberleben wesentlich zu steigern. Es liegt also nahe, dass das verbesserte Lappenüberleben in diesen Tieren mit der über den Versuchszeitraum deutlich gesteigerten dilatatorischen Antwort in Arteriolen und Venulen, sowie mit der auf hohem Niveau aufrechterhaltenen FKD zusammenhängt. Der Effekt von NAC wurde bereits in zahlreichen Studien zur Behandlung des Bluthochdrucks untersucht [Cabassi, Dumont et al. 2001], [Pechanova, Zicha et al. 2006], [Martina et al. 2008], [Zicha et al. 2006]. Eine Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss von NAC auf die Mesenterialgefäße von hypertensiven Ratten. Hierbei zeigte sich, dass in NAC behandelten Ratten nach chronischer Applikation von NAC über 4 Wochen eine signifikante Reduktion des Hypertonus durch eine Vasodilatation der Mesenterialgefäße erzielt werden konnte. Dieser Effekt konnte durch Gabe von L-NAME, einem Inhibitor der NO-Synthetase (Stickstoffsynthetase) blockiert werden, so dass naheliegt, dass der

vasodilatatorische Effekt mit einer NO-Stimulation zusammenhängt [Girouard, Chulak et al. 2003]. Über NO ist bereits lange bekannt, dass es eine wichtige Rolle in der Regulation des Gefäßtonus und in der Entstehung des Hypertonus spielt [Berry, Brosnan et al. 2001], [Vanhoutte 2001], [Wilcox 2002]. Bei einer akuten einmaligen Verabreichung von NAC war ebenfalls eine dilatatorische Antwort in den Mesenterialgefäßen zu verzeichnen, die allerdings nicht mit L-Name zu inhibieren war [Girouard, Chulak et al. 2003]. Dies bedeutet, dass die akute Vasodilatation nicht auf einem NO-Effekt, sondern auf der Reduktion vasokonstriktorisch wirkender ROS (Thromboxan A, Endothelin 1, Superoxidanion) durch NAC beruht. Bezogen auf unser Modell könnte dies erklären, wieso erst gegen Ende der Versuchsperiode eine massive Dilatation und damit ein massiv gesteigerter Blutfluss in den mit NAC behandelten Tieren zu erzielen war. Die am Anfang nur zögerliche Steigerung der Gefäßdurchmesser in Arteriolen und Venulen könnte also auf der Reduktion der ROS beruhen, die auf die akute NAC-Wirkung zurückzuführen ist. Ab dem 7. postoperativen Tag kommt die chronische Wirkung, d.h. die NO-Aktivierung, hinzu und bewirkt eine massive Dilatation der Gefäße. Durch die Kombination aus akuter und chronischer NAC-Wirkung d.h. durch die Reduktion der ROS und v.a. den dilatativen Effekt auf die Arteriolen, konnte somit auch die FKD über den gesamten Versuchszeitraum auf hohem Niveau aufrechterhalten werden.

Die Gabe des Vitamin-E-Analogon Trolox bewirkte in unserer Studie eine Reduktion der Entzündungsantwort, die in etwa derjenigen der NAC-Vorbehandlung entsprach. Ebenso wurde durch Trolox die Zahl der apoptotischen Zellen reduziert. Erstaunlicherweise konnte allerdings gegenüber der Kontrollbehandlung keine wesentliche arterioläre Dilatation festgestellt und im Vergleich zur NAC Vorbehandlung somit auch keine adäquate Reduktion der Lappennekrose erzielt werden.

Die antioxidative und antiapoptotische Wirkung von Trolox und auch von zahlreichen anderen Vitaminen wurde in vielen Studien beschrieben. Eine Arbeitsgruppe zeigte beispielsweise, dass die Gabe des Vitamin-E-Analogon Trolox unmittelbar vor dem Abklemmen der renalen Gefäße den Ischämie-Reperfusionsschaden an der Niere deutlich reduzieren konnte [Salehipour et al. 2009]. In einer anderen Studie wurde bewiesen, dass Trolox in der Lage ist, Thymuszellen vor oxidativem Stress und vor durch Peroxynitrit induzierter Apoptose zu schützen v.a. durch seine Wirkung als Radikalfänger [Salgo and Pryor 1996]. Des Weiteren konnte Trolox den Ischämie-Reperfusionsschaden am Herzen reduzieren. Eine kurzfristige Trolox-Gabe bewirkte eine postischämisch im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigerte Kontraktilität und eine bessere Gefäßfunktionalität [Saleh et al. 2010]. Durch seine antioxidative Wirkung ist Vitamin-E auch in der Lage eine prophylaktische Wirkung zum Schutz vor Schäden durch postoperative Strahlentherapie bei

Zervixkarzinomen zu erzielen [Ismail et al. 2010].

Es existieren zahlreiche weitere Tierstudien, die die protektive Wirkung von Vitamin-E auf zerebrale Zellen, intestinale Zellen sowie Leber und Nierenzellen v.a. im Ischämie- bzw. Reperfusionsschaden zeigen [Mukherjee, Lekli et al. 2008], [Chaudhary, Sinha et al. 2003], [Giakoustidis, Papageorgiou et al. 2006], [Wongmekiat et al. 2007].

Alle diese Studien beschreiben immer wieder die Theorie, dass Trolox als Vitamin-E-Analogon die Lipidperoxidation in Zellen, die unter oxidativem Stress stehen, beeinflusst. Man nimmt an, dass die Bildung von ROS zum Beispiel in Situationen chronischer Ischämie wie in unserer Versuchsreihe dafür verantwortlich ist, dass schwerer oxidativer Stress in den Zellen entsteht und so die Lipidperoxidation in Zellmembranen angeregt wird [Jaeschke and Farhood 1991], [Shibuya, Ohkohchi et al. 1997]. Der Hauptangriffspunkt der Lipidperoxidation ist die zelluläre Membran, da sie ungesättigte Fettsäuren in ihren Polysacchariden enthält. Die Toxizität der Radikale entsteht also dadurch, dass die Lipidperoxidation der ungesättigten Membranphospholipide die Integrität der Membranen zerstört [Nagel, Meyer zu Vilsendorf et al. 1997], [Stahl and Sies 1997; Cadenas and Sies 1998]. Die Konsequenz daraus ist eine mitochondriale Dysfunktion, wie es an einem Modell an Leberzellen gezeigt wurde, und ein Verlust der zellulären Kalziumhomöostase [Rosser and Gores 1995], die letztendlich zu apoptotischem Zelltod führt. Zusätzlich kann der Effekt auf den Lipid- und den Arachidonsäuremetabolismus eine Störung der Mikrozirkulation bewirken. Alpha-Tocopherole wie z.B. Trolox besitzen eine Phytyrylseitenkette, die sich optimal in der Zellmembran positionieren [Chow 1991], [Niki, Kawakami et al. 1985] und so mittels seiner phenolischen Hydroxylseitenkette die Radikale und entsprechend die Lipidperoxidation unterbricht.

Diese Erkenntnisse erklären sehr gut die reduzierte Entzündungsantwort und den deutlich eingeschränkten apoptotischen Zelltod der mit Trolox vorbehandelten Tiere im Gegensatz zu den Kontrolltieren. Erstaunlicherweise konnte dies aber keine über Kontrollniveau aufrechterhaltene FKD erzielen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Alpha-Tocopherol zwar durch seine Fähigkeit zur Radikalreduktion antioxidativ wirkt, jedoch bei dieser Reaktion auch zum Tocopherolradikal oxidiert wird, welches seinerseits prooxidativ wirkt, also andere Moleküle oxidiert [Liebler 1998]. So könnte Trolox zwar kurzfristig die Entzündungsreaktion und den Zelltod mindern, jedoch langfristig reicht der antioxidative Stimulus aufgrund prooxidativer Eigenschaften nicht aus, auch die Mikrozirkulation aufrechtzuerhalten. Diese Eigenschaft gilt für alle nicht enzymatischen Antioxidantien, während dies für enzymatische Antioxidantien noch nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist allerdings bewiesen worden, dass Tocopherol durch Zugabe von Vitamin-C (Ascorbinsäure) oder Glutathion wieder in seinen ursprünglichen Zustand

umgewandelt werden kann und so erst danach wieder als Antioxidans zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu gilt dies nicht für NAC, was seine bessere Wirkung auf die Lappendurchblutung und Aufrechterhaltung der FKD erklären könnte.

In weiteren Studien könnte man also eine gleichzeitige Gabe von Vitamin-E und Vitamin-C oder NAC in Erwägung ziehen, um so einen redundanten Effekt zu erzielen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Trolox eine gewisse Dosisabhängigkeit aufweist. Giakoustidis et al. [2002] konnten zeigen, dass extrem hohe Dosen ( $>10\text{mg/kg KG}$ ) alpha-Tocopherol verabreicht werden müssen, um in vitro in Zellen (in diesem Fall Leberzellen) wirklich konsequent eine Lipidperoxidation zu verhindern und so diese Zellen dauerhaft vor oxidativem Schaden zu schützen [Giakoustidis, Papageorgiou et al. 2002]. Derart hohe Dosen sind in in vivo Experimenten bzw. letztendlich im klinischen Alltag auf Grund der dann toxischen Wirkung aber nicht zu realisieren. Des Weiteren wurde hier alpha-Tocopherol intramuskulär verabreicht, nicht wie in unserem Fall intraperitoneal, so dass die Verabreichungsform ebenfalls ein Grund für die reduzierte Wirkung sein könnte. Es gibt darüber hinaus Hinweise dafür, dass Vitamin E dosisabhängig eine signifikante endothelabhängige Vasodilatation gleichzeitig mit einer Reduktion der Plasma TBARS, ein Marker für die Lipidperoxidation, bewirkt [Motoyama, Kawano et al. 1998]. Die Ursache dafür ist offensichtlich eine dosisabhängige Freisetzung von Prostacyclin, eines potenten Vasodilatators und Inhibitors der Thrombozytenaggregation [Chan and Leith 1981; Gilbert, Zebrowski et al. 1983; Pyke and Chan 1990; Tran and Chan 1990]. Hier wurde allerdings eine Dosis von 300mg alpha-Tocopherol täglich verabreicht, die im Vergleich zu der von uns verabreichten Dosis sehr hoch ist. Dies könnte also eine Erklärung dafür sein, warum in unserer Studie die arteriolen und venösen Durchmesser im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenso wie die kapillaren Durchmesser und somit auch die entsprechenden Blutflüsse nicht wesentlich gesteigert werden konnten.

In einer Versuchsreihe an Ratten über den Einfluss von Vitamin-E auf die Lipidperoxidation und die NO Produktion nach zerebraler Ischämie wurde zusätzlich festgestellt, dass Vitamin E die Lipidperoxidation, aber auch die NO Produktion vermindert. NO ist einerseits zwar ein radikalisch wirkendes Molekül, dessen Verminderung einen positiven Einfluss auf den oxidativen Stress bewirkt, es ist andererseits aber auch ein Molekül, das bewiesenermaßen vasodilatatorisch wirkt und so die Durchblutung im Lappengewebe steigern könnte. Positive Versuche hierzu wurden im Rahmen begleitender Versuche unserer Arbeitsgruppe mit Arginin, einem Aktivator der NO-Synthetase, durchgeführt. Eine Reduktion von NO könnte also auch eine Erklärung für die fehlende Vasodilatation nach Trolox-Gabe und somit die wenig reduzierte Nekrose im Vergleich zur Kontrollgruppe sein.

Zusammenfassend kann man also feststellen, dass die antioxidative Kraft der beiden eingesetzten Substanzen Trolox und NAC ausgereicht hat, die Entzündungsantwort zu reduzieren und den apoptotischen Zelltod weitestgehend zu verhindern. Letzten Endes war allerdings doch die deutliche arterioläre Dilatation in den mit NAC vorbehandelten Tieren sowie deren aufrechterhaltene FKD entscheidend dafür verantwortlich, dass das Lappenüberleben im Vergleich zur Kontrollgruppe und der mit Trolox vorbehandelten Gruppe verbessert werden konnte.

### 7.2.2 Körpereigene Antioxidation

Von der Vorbehandlung mit dem Substrat der Hämoxygenase-1 (HO-1) Hämin (Häm) und deren Abbauprodukt Biliverdin erwarteten wir uns einen ähnlich positiven Einfluss auf die Entzündungsreaktion und somit auch auf die Mikrozirkulation im kritisch ischämischen Lappengewebe, wie es bereits in den Versuchen mit nicht körpereigenen Antioxidantien beschrieben wurde. Die HO-1 wird induziert durch verschiedene Stimuli wie beispielsweise Entzündungsprozesse, aber auch durch Hypoxie. Ebenso induziert ein Anstieg des Häm (Hämin) die HO-1 [Tenhunen, Marver et al. 1969; Willis, Moore et al. 1996; Terry, Clikeman et al. 1998]. Eine Aktivierung der HO-1 hat in vielen Studien positive Einflüsse auf den Entzündungsprozess zeigen können. So konnte es durch seine antioxidativen Eigenschaften protektiv auf Herz und Lungengewebe wirken, welches chronische Hypoxie ausgesetzt war [Vitali et al. 2009]. Weiterhin war es in der Lage die Niere vor akuten Ischämieschäden [Shimizu, Takahashi et al. 2000] und Ischämie-Reperfusionsschäden [Tullius, Nieminen-Kelha et al. 2002] sowie die Leber vor Ischämieschäden [Yang et al. 2009] und sonstigen toxischen Stimuli [Chodorowski et al. 2007] schützen. Genauso sind für Biliverdin zahlreiche positive Eigenschaften beschrieben. Als Abbauprodukt der HO-1 konnte Biliverdin beispielsweise akute Entzündungsreaktionen bei der Dünndarmtransplantation mindern und so das Organversagen verhindern [Nakao, Otterbein et al. 2004].

Erstaunlicherweise lieferten uns die mit Biliverdin und Hämin vorbehandelten Gruppen deutlich schlechtere Ergebnisse als alle anderen untersuchten Behandlungsgruppen. Der initiale Perfusionsausfall in den mit Biliverdin behandelten Tieren führte zu einem Nekroseanteil von über 70% der Lappenfläche und war damit signifikant größer als in der DMSO-Kontrollgruppe, die mit circa 50% Nekrose der NaCl-Kontrollgruppe entsprach. Auch die Häminvorbehandlung ergab einen Nekroseanteil von knapp 60% der Lappenfläche und lag damit deutlich über Kontrollniveau. Dies hängt damit zusammen, dass die Fließgeschwindigkeit sowohl in Venulen als auch in Arteriolen und Kapillaren im



zentralen kritisch durchbluteten Lappenanteil signifikant gegenüber den Kontrolltieren erniedrigt war, so dass der Blutfluss in diesem Teil des Lappens nahezu vollständig sistierte. Zusätzlich kam es zu einem vollständigen Ausfall der nutritiven Perfusion. Die Durchmesser unterschieden sich in allen Gefäßen nicht wesentlich von der Kontrollgruppe. Die leichte Vasodilatation, die sich über den Versuchszeitraum hinweg entwickelte, ist wohl auf den starken Hypoxiereiz im Penumbragebiet am Rande der Nekrose zurückzuführen. Die mit Hämin behandelten Tiere unterschieden sich in der Fließgeschwindigkeit und den Durchmessern der Gefäße nicht wesentlich von der Kontrollgruppe. Der ab dem 3. Tag des Versuches massiv gesteigerte Blutfluss der Arteriolen und Venulen spiegelte sich in dem ab diesem Zeitpunkt leicht rückläufigen Perfusionsausfall wider. Auch hier war die nutritive Perfusion unter dem Niveau der Kontrollgruppe.

Erwähnenswert ist, dass in beiden Gruppen, aber v.a. in der Biliverdingruppe die Bildqualität, die die Voraussetzung für eine zuverlässige Auswertung am Cap-image-System darstellt, durch einen massiven Austritt von Fluoreszenzfarbstoff ins Gewebe und durch massive Ödembildung im Gewebe stark eingeschränkt wurde. Eine Auswertung der Leukozyten und der apoptotischen Zellen war daher nicht möglich, so dass in diesem Studienabschnitt darüber keine statistische Aussage getroffen werden konnte. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die über das natürliche Ausmaß hinausgehende, Ödembildung und die endotheliale Dysfunktion auch eine verstärkte Entzündungsantwort und einen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen bedingen.

Mögliche Erklärungen für die schlechten mikrozirkulatorischen Ergebnisse in diesem Studienabschnitt liefern einige Arbeitsgruppen die zeigen konnten, dass Häm (Hämin) nicht nur durch die Induktion der HO-1 antioxidativ wirkt, sondern zunächst selbst prooxidative Eigenschaften aufweist [Balla, Vercellotti et al. 1991; Wagener, Feldman et al. 1997; Wagener, da Silva et al. 1999; Wagener, Eggert et al. 2001]. Es induziert beispielsweise verschiedene Adhäsionsmoleküle und verursacht eine Steigerung der Gefäßpermeabilität. Entsprechend war ein verstärkter Kontrastmittelaustritt aus den Gefäßen unserer untersuchten Tiere zu beobachten. Außerdem induziert Häm eine Leukozyteninfiltration des Gewebes [Wagener, Eggert et al. 2001], was eine zusätzliche Gefäßschädigung verursachen kann. Es ist also möglich, dass in dem verwendeten Modell die prooxidativen gegenüber den antioxidativen Eigenschaften überwiegen. Eine Arbeitsgruppe aus Tübingen führte einen in vitro Versuch durch, in dessen Verlauf humane Erythrozyten mit Hämin inkubiert wurden. Hierbei ergaben sich deutliche Hinweise darauf, dass Hämin den Zelltod von Erythrozyten bewirkte, was in vivo die Auslösung einer Anämie bedeuten würde [Gatidis, Foller et al. 2009]. Man ging in diesem Versuch zwar davon aus, dass die Verminderung des Hämatokrits und die daraus entstehende Anämie für Menschen, denen Hämin verabreicht

wird, nicht klinisch relevant wäre, allerdings könnte dies bei der Maus mit einem sehr kleinen Blutvolumen schon zutreffen und so Störungen der Mikrozirkulation und in der Folge ein vermindertes Lappenüberleben bewirken.

In einer Studie an der Maus wurde der Einfluss von Biliverdin und Kohlenmonoxid (CO), beides Produkte der HO-1-vermittelten Enzymreaktion, auf die Reduktion von entzündungsvermittelnden Cytokinen, hepatozellulärer Schädigung und Überleben untersucht. Als Ergebnis konnte gezeigt werden, dass nur die kombinierte Gabe von Biliverdin und CO die Cytokinproduktion verringert und somit das Überleben der Mäuse steigern konnte, nicht jedoch die alleinige Gabe der Einzelsubstanzen [Sass, Seyfried et al. 2004]. Dies gäbe uns eine Erklärung, warum Biliverdin alleine nicht in der Lage war, das Lappenüberleben zu verbessern und die Entzündungsreaktion gegenüber der Kontrollgruppe zu mindern. Allerdings erklärt dies trotzdem nicht die massiv eingeschränkte Mikrozirkulation sowie die erstaunlich hohe Nekroserate.

Ein letzter Ansatz zur Erklärung des negativen Einflusses der angewendeten Substanzen ist der Einfluss von DMSO, das Lösungsmittel von Biliverdin und Hämin. DMSO ist eine häufig verwendete Substanz zur Lösung von lipophilen Substanzen. In zwei Studien konnte gezeigt werden, dass DMSO toxische Eigenschaften aufweist. Zum einen zeigten C57BL/6 Mäuse, denen unterschiedliche Dosierung von DMSO verabreicht wurden (0,5% und 1%), eine stark ausgeprägte Apoptose von neuronalen Zellen des zentralen Nervensystems. Es wurde dabei diskutiert, dass diese Schädigung auf einem direkten zytotoxischen Effekt beruht [Hanslick, Lau et al. 2009]. Vergleichbar könnte DMSO auch auf andere Zellen wirken, beispielsweise auf Endothelzellen oder Blutzellen, was entsprechende Nekrosen verursachen könnte. Ähnliche Resultate erzielte eine Studie, die den Einfluss von DMSO auf die Zahl natürlicher Killerzellen (NKZ) in Mäusen mit Leberschaden untersuchte. Hier verursachte DMSO zwar einen Anstieg der NKZ, allerdings auch einen massiven Anstieg der zytotoxischen Effektormoleküle INF-gamma und Granzyme B, so dass eine Anwendung von DMSO trotz der positiven Eigenschaften kritisch zu beurteilen ist. Allerdings ist in unserer Studie das mikrozirkulatorische Ergebnis der DMSO-Kontrollgruppe durchaus vergleichbar mit dem Ergebnis der NaCl-Kontrollgruppe, was gegen eine spezifische Toxizität in unserem Modell spricht.

Insgesamt gibt es in der Literatur lediglich vage Hinweise für die negative Wirkung von Biliverdin und auch Hämin. Aus unserer Erfahrung ist allerdings die Anwendung der Substanzen nicht für die Behandlung von kritisch ischämischem Lappengewebe geeignet. Im Gegenteil, es stellt sogar eine Gefährdung für das Überleben des Gewebes dar.

### 7.2.3 Antiinflammatorische Substanz NS 398

Die perioperative Behandlung der Tiere mit dem selektiven Cox-2 Inhibitor NS 398 konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Reduktion der Lappennekrose erreichen. Dies hängt vor allem damit zusammen, dass die arteriolen und venösen Durchmesser und Fließgeschwindigkeiten in den behandelten Tieren nicht deutlich gegenüber den Kontrolltieren gesteigert werden konnten, im Gegenteil, sogar signifikant erniedrigt waren. Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Analyse in den kapillaren Gefäßen. Erstaunlicherweise konnte die funktionelle Kapillardichte in den mit NS398 behandelten Tieren trotzdem auf signifikant höherem Niveau aufrechterhalten werden. Dieser Effekt könnte mit der deutlich reduzierten Entzündungsreaktion und dem antiapoptotischen Potential der NS 398-Behandlung zusammen hängen.

Die arteriolen Dilatation und der damit gesteigerte Blutfluss ist nach den Erkenntnissen dieser Gesamtstudie allerdings der entscheidende Faktor, der zur Reduktion der Lappennekrose und somit zum Überleben des Lappens beiträgt.

Die Hemmung der Cox-2 durch NS 398 und andere selektive Cox-2-Inhibitoren wurde schon von vielen Arbeitsgruppen als Mittel zur Reduktion entzündlicher Reaktionen unterschiedlichster Ursache eingesetzt. In einer Studie an neugeborenen Ratten wurde - nach Induktion einer zerebralen Ischämie - beispielsweise gezeigt, dass durch den Einsatz eines Cox-2-Inhibitors (NS398) nicht nur der ischämische Hirnschaden, sondern auch die Letalität der Ratten insgesamt sowie das Wachstumsdefizit reduziert werden konnten [Fathali et al. 2010]. Des Weiteren bewirkte der Einsatz eines Cox-2-Inhibitors bei der Ratte die Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens an der Leber nach Transplantation und führte zu einer verbesserten Transplantatfunktion [Oshima et al. 2009]. Abgesehen von der Hemmung von Entzündungsreaktionen wird NS 398 auch häufig in Tumorstudien verwendet. Hier zeigte sich, dass der Einsatz des Cox-2-Hemmers bei den unterschiedlichsten Tumoren (Adenokarzinome des Ösophagus, kolorektale Tumore, Bronchialkarzinome) die Induktion von Apoptose und somit den Rückgang des Tumorwachstums bewirkte [Rhonda F et al., 2000; Elder DJE et al., 2000; Hida T et al., 2006]. Die Induktion von Apoptose wäre im vorliegenden Modell allerdings eine unerwünschte Wirkung.

In wieweit NS 398 auf das Lappenüberleben wirken könnte, jenseits der anzunehmenden Reduktion der entzündlichen Reaktion durch die bekannte Cox-2-Hemmung, ist bisher nicht bekannt. Eine Arbeitsgruppe aus Ungarn beschäftigte sich mit dem Thema, ob NS 398 die neuronale Funktion nach oxidativem Stress durch Hypoxiereiz (Ischämie-Reperfusion) erhalten kann [Domoki, Perciaccante et al. 2001]. Es war bekannt,

dass das Enzym Cox-2 entscheidend an der Induktion mikrovaskulärer Schäden nach Ischämie beteiligt ist [Nogawa, Zhang et al. 1997], [Zuckerman, Mirro et al. 1994]. Die neuronale Funktion konnte anhand der NMDA induzierten vaskulären Dilatation untersucht werden. NMDA war in der Lage, arterioläre Gefäße im neuronalen Cortex zu erweitern [Busija and Meng 1993], [Veltkamp, Domoki et al. 1998]. Allerdings wird dieser Mechanismus durch sehr kurze Hypoxieperioden empfindlich gefährdet. NS 398 war in dieser Studie in der Lage, durch Cox-2-Hemmung die arterioläre Dilatation nach Hypoxiereiz durch Ischämie-Reperfusion komplett aufrechtzuerhalten. Man hätte also erwarten können, dass dies in unserer Studie ebenfalls der Fall sein könnte und dass NS 398 vielleicht sogar eine zusätzliche arterioläre Dilatation erreichen könnte. Die negativen Ergebnisse unserer Studie könnten zum einen damit zusammen hängen, dass dieser Effekt in der beschriebenen Studie dosisabhängig war. Nur eine hohe Dosis von 5mg/kg KG konnte die arterioläre Dilatation aufrechterhalten. Die von uns verabreichte Dosis von 0,8mg/kg KG könnte also zu niedrig gewesen sein, um einen derartigen Effekt zu erzielen. Außerdem könnte die Verabreichungsform eine Ursache für den fehlenden Erfolg in unserer Studie gewesen sein. Die intravenöse Gabe erlaubt eine schnellere Resorption, so dass die Gabe 30 Minuten vor Ischämieauslösung ausreicht, um einen Effekt zu erzielen. Die von uns und auch vielen anderen Arbeitsgruppen gewählte intraperitoneale Gabe hätte bei langsamerer Resorption eventuell einen früheren Verabreichungszeitpunkt erfordert.

Der Vergleich verschiedener Studien, die NS 398 zum Schutz von Gewebe gegen Ischämie eingesetzt haben, bestätigt, dass die Wirkung des Cox-2-Hemmers kontrovers diskutiert wird. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass eine Gentherapie mit der induzierbaren Form der NO-Synthetase (iNOS) das Ausmaß der Gewebeschädigung beim Myokardinfarkt über einen Cox-2-abhängigen Mechanismus reduzieren kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die natürlich im Körper vorhandene iNOS kardioprotektive Eigenschaften aufweist [Bolli 2000], [Bolli, Dawn et al. 1998], [Bolli 2001]. Es war also die Idee, durch künstliche Hochregulierung dieses Enzyms seine protektive Wirkung zu steigern. Hierbei hat man herausgefunden, dass die Hochregulierung dieses Enzyms mit der Hochregulierung der Cox-2 einhergeht. Der protektive Effekt der iNOS war durch die Cox-2-Blockade mit NS 398 vollständig aufgehoben worden [Li, Guo et al. 2003]. Da NO, welches durch die NO-Synthase produziert wird, vasodilatierend wirkt, könnte dies also ein Grund dafür sein, warum in dem vorliegenden Modell die Blockade der Cox-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer Vasokonstriktion und somit mit einem eher gewebeschädigenden Effekt einher ging. Einen ähnlichen Effekt zeigte eine Studie an Ratten. Hier fand man heraus, dass die durch Lipopolysaccharide oder Cytokine induzierte Dilatation zerebraler

Arteriolen ebenfalls, zumindest zum Teil, Cox-2-abhängig ist, da sie durch NS 398 aufgehoben werden konnte [Brian, Moore et al. 1998]. Auch dies könnte die Ergebnisse unserer Studie erklären. Eine weitere Erklärung für den fehlenden positiven Effekt von NS 398 auf das Lappenüberleben könnte auch eine Arbeitsgruppe geben, die beweisen konnte, dass die Wirkung von NS 398 auf das Infarktvolumen und die neurologischen Defizite nach akuter zerebraler Ischämie erst über 24 Stunden nach NS 398-Gabe - also verspätet - auftritt. Der Applikationszeitpunkt unserer Studie - 30 Minuten vor Ischämieinduktion - wäre in diesem Fall also viel zu spät gewählt. Wenn die Wirkung erst nach 24 Stunden einsetzt, könnten zu diesem Zeitpunkt schon irreversible Nekrosen entstanden sein [Sugimoto and Iadecola 2003].

Weiterhin unklar bleibt allerdings die Tatsache, dass zwar über den Versuchszeitraum von 14 Tagen nie eine signifikante Reduktion der Nekrose in den NS 398 behandelten Tieren zu verzeichnen war, dass jedoch im Verlauf der initiale Perfusionsausfall in den behandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe insgesamt rückläufig war. Dies könnte, zumindest teilweise, damit zusammenhängen, dass die Gefäße gegen Ende des Versuches, durch den chronischen Hypoxiereiz im Übergangsbereich zur Nekrose, nach ihren Möglichkeiten maximal dilatieren und so diesen „Penumbra-Bereich“ wieder für eine Durchblutung zugänglich machen konnten.

Einen anderen Erklärungsansatz bietet eine Studie aus Tokyo von einer Arbeitsgruppe, die an einem Hautinzisionsmodell an Ratten herausfinden konnte, dass das Enzym Cox-2 entscheidend am Wundheilungsprozess beteiligt ist. Hier beginnt die Aktivität der Cox-2 12 Stunden nach der Induktion der Hautschädigung und hat ihren Höhepunkt 3 Tage nach Trauma. Durch die Gabe des Cox-2-Hemmers NS 398 wurde die Reepithelialisierung deutlich verzögert und Angiogenese verhindert. Es ist also möglich, dass gerade durch die Gabe von NS 398 der Wundheilungsprozess nicht wie von uns gewünscht beschleunigt und damit Nekrose verhindert wurde, sondern genau das Gegenteil erreicht wurde [Futagami, Ishizaki et al. 2002]. NS 398 hat als Inhibitor der Cox-2, die entscheidend an der Initiation des Entzündungsprozesses beteiligt ist, antiinflammatorische Eigenschaften. Es gibt allerdings Hinweise dafür, dass die Hemmung des Entzündungsprozesses eventuell mit der Wundheilung von Muskelgewebe interferieren könnte. Eine Arbeitsgruppe hat in vitro und in vivo den Einfluss von NS 398 auf den Heilungsprozess an Skelettmuskeln (M. gastrocnemius) an C57BL/6-Mäusen getestet. Hierbei hat sich gezeigt, dass NS 398 durch die Blockierung der Bildung von Muskelvorläuferzellen den Heilungsprozess einerseits entscheidend verzögert, zusätzlich aber auch durch die vermehrte Produktion des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 die Entstehung einer Gewebefibrose beschleunigt [Shen, Li et al.

2005]. Diese Tatsache könnte zum einen die fehlende positive Wirkung auf die Lappennekrose im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erklären, andererseits aber auch einen Hinweis darauf geben, warum der Rückgang des initialen Perfusionsausfalls erst gegen Ende des Versuchs auftritt.

Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass NS 398 antiinflammatorische Eigenschaften sowie antioxidative Eigenschaften aufweist und so die Zahl der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, die entscheidend am Entzündungsprozess beteiligt sind, reduziert werden [Shen, Li et al. 2005]. Es ist allerdings bekannt, dass Makrophagen eine wichtige Rolle im Muskelheilungsprozess spielen. Durch Phagozytose von geschädigtem Gewebe und durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sowie durch direkten Kontakt mit den Muskelvorläuferzellen tragen Makrophagen entscheidend zur Muskelregeneration bei [Cantini, Massimino et al. 1994; Lescaudron, Peltekian et al. 1999; Merly, Lescaudron et al. 1999; Chazaud, Sonnet et al. 2003]. Daraus kann man schließen, dass NSAID im Allgemeinen und NS 398 im Speziellen mit Vorsicht zur Muskelregeneration zu verabreichen sind, da die unterschiedlichen Wirkungen sich gegenseitig negativ beeinflussen können.

Die eigentliche und überwiegend bekannte Wirkung von NS 398 ist seine Funktion als Hemmer der Cox-2, die maßgeblich an der Entstehung und Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses beteiligt ist. Die Cox-2 wird, wie bereits in der Einleitung beschrieben, durch verschiedene Stimuli, so auch oxidativen Stress, der in unserem Fall wiederum durch Ischämie ausgelöst ist, aktiviert. In der Folge werden verschiedene proinflammatorische Produkte wie z.B. Prostaglandin E freigesetzt, die die Migration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ins Gewebe fördern [Wadleigh and Herschman 1999]. Diese Entzündungsreaktion ist nicht zuletzt mit an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und dem damit einhergehenden Lappenverlust beteiligt. Die Tatsache, dass auch in unserer Studie die Anzahl der rollenden und adhärenen Leukozyten über den Versuchszeitraum in den mit NS 398 behandelten Tieren signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert werden konnten, ist somit die erwartete Wirkung, die bereits in zahlreichen Studien vorher bewiesen werden konnte und auf der Hemmung des Entzündungsprozesses durch die Inaktivierung der Cox-2 beruht [Crofford, Wilder et al. 1994; Masferrer, Zweifel et al. 1994; Smith, Garavito et al. 1996].

Kontroverser wird die Wirkung von NS 398 auf den apoptotischen Zelltod diskutiert. In vielen Studien zur Tumorforschung wurde NS 398 erfolgreich zur Apoptoseinduktion und zur Verhinderung von Tumorwachstum verwendet. So zeigte eine vitro Studie, dass NS 398 über die Hemmung der Cox-2 verschiedene „Tumorüberlebensgene“ exprimiert, die in der Lage

sind, die Apoptose von Zellen eines hepatozellulären Karzinoms zu induzieren und so deren Wachstum zu hemmen [Song, Kim et al. 2008]. Ebenso fand eine Arbeitsgruppe aus China heraus, dass NS 398 die Proliferation von humanen Ösophaguskarzinomzellen hemmt und deren Apoptose auslöst. Die Ursache dafür ist offensichtlich ebenfalls eine Hemmung der Cox-2 und die damit einhergehende Proteinexpression, die Hemmung des Transkriptionsfaktors nF-kappaB und der Anstieg verschiedener Zytoplasmafaktoren [Liu, Zhu et al. 2009]. Vergleichbare Effekte konnten an Pankreaskarzinomzellen und an Pneumozyten in Rattenlungen mit Surfactantmangel beobachtet werden [Sun, Chen et al. 2009], [Lukkarinen, Laine et al. 2006]. Diese Beobachtungen bestätigten sich in unserer Studie nicht, im Gegenteil, die Zahl der apoptotischen Zellen konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe im proximalen Areal deutlich, im zentralen und distalen Lappenareal sogar signifikant reduziert werden. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass es noch einen von der Cox-2 unabhängigen Weg gibt, Zytotoxizität durch NS 398 zu verhindern, die unsere, von den meisten Studien abweichende, Ergebnisse erklären könnten. Eine Studie von Park et al. [2007] bewies, dass die Gabe von NS 398 über eine Aktivierung der HO-1 (Hämoxygenase 1) den Zelltod von C6 Gliazellen, die Hypoxie und zusätzlichem oxidativem Stress durch Glukoseoxygenase ausgesetzt waren, verhindern konnte und die ROS-Produktion deutlich mindern konnte. Durch Zinkprotoporphyrin, einem HO-1 Inhibitor, konnte dieser Effekt aufgehoben werden, was darauf hinweist, dass diese Wirkung von NS-398 unabhängig von der Cox-2-Hemmung funktioniert [Park, Kim et al. 2007]. Eine andere Studie lieferte Beweise dafür, dass NS-398 über eine HO-1 Induktion Zellen vor Natrium-Nitroprussid induzierter Zytotoxizität bewahren konnte. Auch dies war unabhängig von der Cox-2-Hemmung [Nizamutdinova, Lee et al. 2009].

Zusammenfassend kann man sagen, dass NS 398 einen negativen bzw. keinen Einfluss auf die Gefäßdurchmesser hatte und so nicht in der Lage war, den Blutfluss zu steigern und dadurch auch die Lappennekrose im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant zu reduzieren. Allerdings konnte durch die Cox-2-Hemmung die Entzündungsreaktion deutlich vermindert und über einen von der Cox-2-Hemmung unabhängigen Weg ebenso die Apoptose verhindert werden. Auf diese Weise konnte zumindest die nutritive Perfusion des Lappens auf erhöhtem Niveau aufrechterhalten werden. Die Tatsache, dass sich der Perfusionsausfall im Vergleich zur Kontrollgruppe über den Versuchszeitraum reduzierte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich das Lappengewebe im Verlauf durch erhaltene Kapillarperfusion nochmals erholen könnte.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Abate C, Patel L, Rauscher FJ 3rd, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science*. 1990 Sep 7;249(4973):1157-61.
2. Abla LE, Gomes HC, Percario S, Ferreira LM. Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta Cir Bras*. 2005 Mar-Apr;20(2):121-3.
3. Abraham NG, Lin JH, Mitrione SM, Schwartzman ML, Levere RD, Shibahara S. Expression of heme oxygenase gene in rat and human liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Jan 29;150(2):717-22.
4. Alcaraz MJ, Fernández P, Guillén MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des*. 2003;9(30):2541-51. Review.
5. Kowada M, Ames A 3rd, Majno G, Wright RL. Cerebral ischemia. I. An improved experimental method for study; cardiovascular effects and demonstration of an early vascular lesion in the rabbit. *J Neurosurg*. 1968 Feb;28(2):150-7.
6. Amon M, Laschke MW, Harder Y, Vollmar B, Menger MD. Impact of severity of local soft-tissue trauma on long-term manifestation of microcirculatory and microlymphatic dysfunctions. *J Trauma*. 2006 Oct;61(4):924-32.
7. Anderson MT, Staal FJ, Gitler C, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 22;91(24):11527-31.
8. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*. 1989;6(6):593-7.
9. Aspegren K, Breine U. Microcirculatory studies in man by high resolution vital microscopy. *Angiology*. 1964 Aug;15:329-32.
10. Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest*. 1991 May;64(5):648-55.
11. Behr J, Maier K, Degenkolb B, Krombach F, Vogelmeier C. Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. Adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Dec;156(6):1897-901.
12. Berry C, Brosnan MJ, Fennell J, Hamilton CA, Dominiczak AF. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001 Mar;10(2):247-55.
13. Bohmert H, Baumeister R. Skin plastic surgery and skin transplantation. *Chirurg*. 1975 Jul;46(7):293-8.
14. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res*. 2000 Nov 24;87(11):972-83.
15. Brian JE Jr, Moore SA, Faraci FM. Expression and vascular effects of cyclooxygenase-2 in brain. *Stroke*. 1998 Dec;29(12):2600-6.
16. Busija DW, Meng W. Retention of cerebrovascular dilation after cortical spreading depression in anesthetized rabbits. *Stroke*. 1993 Nov;24(11):1740-4; discussion 1744-5.



17. Cabassi A, Dumont EC, Girouard H, Bouchard JF, Le Jossec M, Lamontagne D, Besner JG, de Champlain J. Effects of chronic N-acetylcysteine treatment on the actions of peroxynitrite on aortic vascular reactivity in hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001 Jul;19(7):1233-44.
18. Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free Radic Res*. 1998 Jun;28(6):601-9.
19. Cai S, Chen P, Zhang C, Chen JB, Wu J. Oral N-acetylcysteine attenuates pulmonary emphysema and alveolar septal cell apoptosis in smoking-induced COPD in rats. *Respirology*. 2009 Apr;14(3):354-9.
20. Cakir O, Oruc A, Kaya S, Eren N, Yildiz F, Erdinc L. N-acetylcysteine reduces lung reperfusion injury after deep hypothermia and total circulatory arrest. *J Card Surg*. 2004 May-Jun;19(3):221-5.
21. Cantini M, Massimino ML, Bruson A, Catani C, Dalla Libera L, Carraro U. Macrophages regulate proliferation and differentiation of satellite cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Aug 15;202(3):1688-96.
22. Cardon SZ, Oestermeyer CF, Bloch EH. Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res*. 1970 Jan;2(1):67-76.
23. Cassol OJ Jr, Rezin GT, Petronilho FC, Scaini G, Gonçalves CL, Ferreira GK, Roesler R, Schwartzmann G, Dal-Pizzol F, Streck EL. Neurochem Res. 2009 Nov 13. Effects of N-Acetylcysteine/Deferoxamine, Taurine and RC-3095 on Respiratory Chain Complexes and Creatine Kinase Activities in Rat Brain After Sepsis.
24. Chan AC, Leith MK. Decreased prostacyclin synthesis in vitamin E-deficient rabbit aorta. *Am J Clin Nutr*. 1981 Nov;34(11):2341-7.
25. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 15;99(21):13926-31. Epub 2002 Sep 19.
26. Chaudhary G, Sinha K, Gupta YK. Protective effect of exogenous administration of alpha-tocopherol in middle cerebral artery occlusion model of cerebral ischemia in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003 Dec;17(6):703-7.
27. Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol*. 2003 Dec 8;163(5):1133-43.
28. Chodorowski Z, Sein Anand J, Rybakowska I, Kaletha K. Heme oxygenase as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *Przegl Lek*. 2007;64(4-5):360-2.
29. Chow CK. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(2):215-32.
30. Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol*. 1997;38:205-27.
31. Crofford LJ, Wilder RL, Ristimäki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest*. 1994 Mar;93(3):1095-101.
32. Datta PK, Lianos EA. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. *Kidney Int*. 1999 May;55(5):1734-9.
33. Dekhuijzen PN. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2004 Apr;23(4):629-36.

34. Doba T, Burton GW, Ingold KU. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta*. 1985 Jul 9;835(2):298-303.
35. Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T, Shibahara S, Ogawa M, Maeda H. Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer*. 1999 Aug;80(12):1945-54.
36. Domoki F, Perciaccante JV, Puskar M, Bari F, Busija DW. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 preserves neuronal function after hypoxia/ischemia in piglets. *Neuroreport*. 2001 Dec 21;12(18):4065-8.
37. Domoki F, Perciaccante JV, Puskar M, Bari F, Busija DW. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 preserves neuronal function after hypoxia/ischemia in piglets. *Neuroreport*. 2001 Dec 21;12(18):4065-8.
38. Dong GH, Wang CT, Li Y, Xu B, Qian JJ, Wu HW, Jing H. Cardiopulmonary bypass induced microcirculatory injury of the small bowel in rats. *World J Gastroenterol*. 2009 Jul 7;15(25):3166-72.
39. Elder DJ, Halton DE, Crew TE, Paraskeva C. Apoptosis induction and cyclooxygenase-2 regulation in human colorectal adenoma and carcinoma cell lines by the cyclooxygenase-2-selective non-steroidal anti-inflammatory drug NS-398. *Int J Cancer*. 2000 May 15;86(4):553-60.
40. Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)*. 1980;177(2):125-34.
41. Fathali N, Ostrowski RP, Lekic T, Jadhav V, Tong W, Tang J, Zhang JH. Cyclooxygenase-2 inhibition provides lasting protection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Crit Care Med*. 2010 Feb;38(2):572-8.
42. Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Dec;222(3):236-45.
43. Funk W, Endrich B, Messmer K. A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med (Berl)*. 1986;186(4):259-70.
44. Furuke K, Shiraishi M, Mostowski HS, Bloom ET. Fas ligand induction in human NK cells is regulated by redox through a calcineurin-nuclear factors of activated T cell-dependent pathway. *J Immunol*. 1999 Feb 15;162(4):1988-93.
45. Futagami A, Ishizaki M, Fukuda Y, Kawana S, Yamanaka N. Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Lab Invest*. 2002 Nov;82(11):1503-13.
46. Galla TJ, Saetzler RK, Hammersen F, Messmer K. Increase in skin-flap survival by the vasoactive drug buflomedil. *Plast Reconstr Surg*. 1991 Jan;87(1):130-6; discussion 137-8.
47. Gatidis S, Föller M, Lang F. Hemin-induced suicidal erythrocyte death. *Ann Hematol*. 2009 Aug;88(8):721-6. Epub 2009 Jan 29.
48. Ghezzi PM, Gervasio R, Tessore V, Sartoris AM, Botella J. Hemodiafiltration without replacement fluid. An experimental study. *ASAIO J*. 1992 Jan-Mar;38(1):61-5.
49. Giakoustidis D, Papageorgiou G, Iliadis S, Kontos N, Kostopoulou E, Papachrestou A, Tsantilas D, Spyridis C, Takoudas D, Botsoglou N, Dimitriadou A, Giakoustidis E. Intramuscular administration of very high dose of alpha-tocopherol protects liver from severe ischemia/reperfusion injury. *World J Surg*. 2002 Jul;26(7):872-7. Epub 2002 Apr 18.

50. Gilbert VA, Zebrowski EJ, Chan AC. Differential effects of megavitamin E on prostacyclin and thromboxane synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm Metab Res.* 1983 Jul;15(7):320-5.
51. Girouard H, Chulak C, Wu L, Lejossec M, de Champlain J. N-acetylcysteine improves nitric oxide and alpha-adrenergic pathways in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2003 Jul;16(7):577-84.
52. Han JY, Horie Y, Fan JY, Sun K, Guo J, Miura S, Hibi T. Potential of 3,4-dihydroxy-phenyl lactic acid for ameliorating ischemia-reperfusion-induced microvascular disturbance in rat mesentery. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009 Jan;296(1):G36-44. Epub 2008 Nov 13.
53. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, Farber NB. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis.* 2009 Apr;34(1):1-10. Epub 2008 Dec 3.
54. Harder Y, Amon M, Georgi M, Banic A, Erni D, Menger MD. Evolution of a "falx lunatica" in demarcation of critically ischemic myocutaneous tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Mar;288(3):H1224-32. Epub 2004 Oct 28.
55. Harrison PM, Wendon JA, Gimson AE, Alexander GJ, Williams R. Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med.* 1991 Jun 27;324(26):1852-7.
56. Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, Masuda A, Shimizu S, Mitsudomi T, Sugiura T, Ogawa M, Takahashi T. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 2000 May;6(5):2006-11.
57. Hobbs JB, Chusilp S, Hua A, Kincaid-Smith P, McIver MA. The pathogenesis of hypertensive vascular changes in the rat: microscopic and ultrastructural correlation in vivo. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1976 Dec;3:73s-75s.
58. Horváth I, Donnelly LE, Kiss A, Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax.* 1998 Aug;53(8):668-72.
59. Ingold KU, Webb AC, Witter D, Burton GW, Metcalfe TA, Muller DP. Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch Biochem Biophys.* 1987 Nov 15;259(1):224-5.
60. Ishizaka N, de León H, Laursen JB, Fukui T, Wilcox JN, De Keulenaer G, Griendling KK, Alexander RW. Angiotensin II-induced hypertension increases heme oxygenase-1 expression in rat aorta. *Circulation.* 1997 Sep 16;96(6):1923-9.
61. Ismail MS, Amer AS, Wahba O, Shalby H, Arian F. Effect of antioxidants on markers of apoptosis in postoperative radiotherapy of cancer cervix. *Gulf J Oncolog.* 2010 Jan;(7):8-13.
62. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol.* 1991 Mar;260(3 Pt 1):G355-62.
63. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem.* 1993 Apr 25;268(12):9049-54.
64. Leaf A. Cell swelling. A factor in ischemic tissue injury. *Circulation.* 1973 Sep;48(3):455-8.
65. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol.* 1993 Oct;143(4):1055-62.

66. Lescaudron L, Peltékian E, Fontaine-Pérus J, Paulin D, Zampieri M, Garcia L, Parrish E. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul Disord*. 1999 Mar;9(2):72-80.
67. Li Q, Guo Y, Xuan YT, Lowenstein CJ, Stevenson SC, Prabhu SD, Wu WJ, Zhu Y, Bolli R. Gene therapy with inducible nitric oxide synthase protects against myocardial infarction via a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Circ Res*. 2003 Apr 18;92(7):741-8.
68. Liebler DC. Antioxidant chemistry of alpha-tocopherol in biological systems. Roles of redox cycles and metabolism. *Subcell Biochem*. 1998;30:301-17.
69. Liu JF, Zhu GJ, Jamieson GG, Wu TC, Zhu TN, Shan BE, Drew PA. NS-398 induces apoptosis in human esophageal cancer cells through inhibition of NF-kappaB downstream regulation of cyclooxygenase-2. *Cancer Invest*. 2009 Jan;27(1):17-23.
70. Liu YX, Jin LM, Zhou L, Xie HY, Jiang GP, Wang Y, Feng XW, Chen H, Yan S, Zheng SS. Mycophenolate mofetil attenuates liver ischemia/reperfusion injury in rats. *Transpl Int*. 2009 Jul;22(7):747-56. Epub 2009 Mar 26.
71. Lukkarinen H, Laine J, Aho H, Asikainen E, Penttinen P, Kääpä P. Inhibition of COX-2 aggravates neutrophil migration and pneumocyte apoptosis in surfactant-depleted rat lungs. *Pediatr Res*. 2006 Mar;59(3):412-7.
72. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:517-54.
73. Maines MD, Trakshel GM. Purification and characterization of human biliverdin reductase. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Jan;300(1):320-6.
74. Martina V, Masha A, Gigliardi VR, Brocato L, Manzato E, Berchio A, Massarenti P, Settanni F, Della Casa L, Bergamini S, Iannone A. Long-term N-acetylcysteine and L-arginine administration reduces endothelial activation and systolic blood pressure in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2008 May;31(5):940-4. Epub 2008 Feb 11.
75. Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, Kawasaki T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by alpha-tocopherol administration. *Surgery*. 1986 Feb;99(2):184-92.
76. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 12;91(8):3228-32.
77. McGregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. *Br J Plast Surg*. 1973 Jul;26(3):202-13.
78. Menger MD, Lehr HA. Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today*. 1993 Nov;14(11):519-22.
79. Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol*. 1992 Dec;263(6 Pt 2):H1892-900.
80. Menger MD, Sack FU, Hammersen F, Messmer K. Tissue oxygenation after prolonged ischemia in skeletal muscle: therapeutic effect of prophylactic isovolemic hemodilution. *Adv Exp Med Biol*. 1989;248:387-95.
81. Menger MD, Jäger S, Walter P, Hammersen F, Messmer K. A novel technique for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1990 Feb;9(1):103-17.
82. Menger MD, Laschke MW, Vollmar B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res*. 2002 Jan-Apr;34(1-2):83-91.

83. Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut MF. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve*. 1999 Jun;22(6):724-32.
84. Moldéus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration*. 1986;50 Suppl 1:31-42.
85. Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Feb 28;92(5):1475-9.
86. Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Hirashima O, Ohgushi M, Tsunoda R, Moriyama Y, Miyao Y, Yoshimura M, Ogawa H, Yasue H. Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Nov 15;32(6):1672-9.
87. Mukherjee S, Lekli I, Das M, Azzi A, Das DK. Cardioprotection with alpha-tocopheryl phosphate: amelioration of myocardial ischemia reperfusion injury is linked with its ability to generate a survival signal through Akt activation. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Sep;1782(9):498-503. Epub 2008 May 22.
88. Nagel E, Meyer zu Vilsendorf A, Bartels M, Pichlmayr R. Antioxidative vitamins in prevention of ischemia/reperfusion injury. *Int J Vitam Nutr Res*. 1997;67(5):298-306.
89. Nakao A, Otterbein LE, Overhaus M, Sarady JK, Tsung A, Kimizuka K, Nalesnik MA, Kaizu T, Uchiyama T, Liu F, Murase N, Bauer AJ, Bach FH. Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. *Gastroenterology*. 2004 Aug;127(2):595-606.
90. Niki E, Kawakami A, Saito M, Yamamoto Y, Tsuchiya J, Kamiya Y. Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J Biol Chem*. 1985 Feb 25;260(4):2191-6.
91. Nizamutdinova IT, Lee JH, Seo HG, Chang KC, Kim HJ. NS398 protects cells from sodium nitroprusside-mediated cytotoxicity through enhancing HO-1 induction independent of COX-2 inhibition. *Arch Pharm Res*. 2009 Jan;32(1):99-107. Epub 2009 Jan 29.
92. Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci*. 1997 Apr 15;17(8):2746-55.
93. Oda T, Lehmann A, Endrich B. Capillary blood flow in the amelanotic melanoma of the hamster after isovolemic hemodilution. *Biorheology*. 1984;21(4):509-20.
94. Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res*. 1979 Nov;18(3):311-8.
95. Oshima K, Yabata Y, Yoshinari D, Takeyoshi I. The effects of cyclooxygenase (COX)-2 inhibition on ischemia-reperfusion injury in liver transplantation. *J Invest Surg*. 2009 Jul-Aug;22(4):239-45.
96. Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A. N-acetyl cysteine mediates protection from 2-hydroxyethyl methacrylate induced apoptosis via nuclear factor kappa B-dependent and independent pathways: potential involvement of JNK. *Toxicol Sci*. 2009 Apr;108(2):356-66. Epub 2009 Jan 28. PMID: 19176594
97. Park MK, Kim CH, Kim YM, Kang YJ, Kim HJ, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC. Akt-dependent heme oxygenase-1 induction by NS-398 in C6 glial cells: a potential role for CO in prevention of oxidative damage from hypoxia. *Neuropharmacology*. 2007 Sep;53(4):542-51. Epub 2007 Jul 1.
98. Pechánová O, Zicha J, Kojsová S, Dobesová Z, Jendeková L, Kunes J. Effect of chronic N-acetylcysteine treatment on the development of spontaneous hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2006 Feb;110(2):235-42.
99. Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF Jr, Dikdan GS. Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis. *Am Surg*. 1991 Feb;57(2):86-8.

100. Pyke DD, Chan AC. Effects of vitamin E on prostacyclin release and lipid composition of the ischemic rat heart. *Arch Biochem Biophys.* 1990 Mar;277(2):429-33.
101. Rezaeian F, Wettstein R, Amon M, Scheuer C, Schramm R, Menger MD, Pittet B, Harder Y. Erythropoietin protects critically perfused flap tissue. *Ann Surg.* 2008 Dec;248(6):919-29.
102. Rosati E, Sabatini R, Ayroldi E, Tabilio A, Bartoli A, Bruscoli S, Simoncelli C, Rossi R, Marconi P. Apoptosis of human primary B lymphocytes is inhibited by N-acetyl-L-cysteine. *J Leukoc Biol.* 2004 Jul;76(1):152-61. Epub 2004 Apr 1.
103. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology.* 1995 Jan;108(1):252-75.
104. Rücker M, Roesken F, Schäfer T, Spitzer WJ, Vollmar B, Menger MD. In vivo analysis of the microcirculation of osteomyocutaneous flaps using fluorescence microscopy. *Br J Plast Surg.* 1999 Dec;52(8):644-52.
105. Saleh NK, Saleh HA. Protective effects of vitamin E against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Saudi Med J.* 2010 Feb;31(2):142-7.
106. Salehipour M, Monabbati A, Salahi H, Nikeghbalian S, Bahador A, Marvasti VE, Rezaei H, Kazemi K, Dehghani M, Mohammadian R, Malek-Hosseini SA. Protective Effect of Parenteral Vitamin E on Ischemia-reperfusion Injury of Rabbit Kidney. *Urology.* 2009 Jul 15.
107. Salgo MG, Pryor WA. Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1996 Sep 15;333(2):482-8.
108. Salmi AM. Breast reconstruction with free transverse rectus abdominis myocutaneous flaps in hospitals unaccustomed to microsurgery: original retrospective study. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2005;39(3):153-7.
109. Sass G, Seyfried S, Parreira Soares M, Yamashita K, Kaczmarek E, Neuhuber WL, Tiegs G. Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury. *Hepatology.* 2004 Nov;40(5):1128-35.
110. Sato H, Siow RC, Bartlett S, Taketani S, Ishii T, Bannai S, Mann GE. Expression of stress proteins heme oxygenase-1 and -2 in acute pancreatitis and pancreatic islet betaTC3 and acinar AR42J cells. *FEBS Lett.* 1997 Mar 24;405(2):219-23.
111. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg.* 2004 Feb;239(2):220-31.
112. Shen W, Li Y, Tang Y, Cummins J, Huard J. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *Am J Pathol.* 2005 Oct;167(4):1105-17.
113. Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K, Satomi S. Kupffer cells generate superoxide anions and modulate lipid peroxidation and mitochondrial proton ATP-ASE activity in the perfused rat liver after cold preservation. *Transplant Proc.* 1997 Feb-Mar;29(1-2):1328-30.
114. Shimizu H, Takahashi T, Suzuki T, Yamasaki A, Fujiwara T, Odaka Y, Hirakawa M, Fujita H, Akagi R. Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure. *Crit Care Med.* 2000 Mar;28(3):809-17.
115. Silver IA. Ion fluxes in hypoxic tissues. *Microvasc Res.* 1977 May;13(3):409-20.
116. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* 1996 Dec 27;271(52):33157-60.

117. Song IH, Kim DW, Shin KC, Shin HD, Yun SY, Kim SB, Shin JE, Kim HJ, Kim EY. Down-regulation of survivin in growth inhibition of hepatoma cells induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Korean J Hepatol*. 2008 Sep;14(3):351-9.
118. Stahl W, Sies H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*. 1997 Sep;46 Suppl 2:S14-8. 2.
119. Steiner AA, Branco LG, Cunha FQ, Ferreira SH. Role of the haeme oxygenase/carbon monoxide pathway in mechanical nociceptor hypersensitivity. *Br J Pharmacol*. 2001 Apr;132(8):1673-82.
120. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987 Feb 27;235(4792):1043-6.
121. Sugimoto K, Iadecola C. Delayed effect of administration of COX-2 inhibitor in mice with acute cerebral ischemia. *Brain Res*. 2003 Jan 17;960(1-2):273-6.
122. Sun WH, Chen GS, Ou XL, Yang Y, Luo C, Zhang Y, Shao Y, Xu HC, Xiao B, Xue YP, Zhou SM, Zhao QS, Ding GX. Inhibition of COX-2 and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma synergistically inhibits proliferation and induces apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2009 Mar 18;275(2):247-55. Epub 2008 Dec 3.
123. Szczesny G, Nolte D, Veihelmann A, Messmer K. A new chamber technique for intravital microscopic observations in the different soft tissue layers of mouse hindleg. *J Trauma*. 2000 Dec;49(6):1108-15.
124. Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, Mizuno T, Tohyama M. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 1999 Mar 26;274(13):8531-8.
125. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem*. 1969 Dec 10;244(23):6388-94.
126. Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol*. 1998 Mar;274(3 Pt 2):H883-91.
127. Tran K, Chan AC. R,R,R-alpha-tocopherol potentiates prostacyclin release in human endothelial cells. Evidence for structural specificity of the tocopherol molecule. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Apr 2;1043(2):189-97.
128. Tullius SG, Nieminen-Kelhä M, Buelow R, Reutzel-Selke A, Martins PN, Pratschke J, Bachmann U, Lehmann M, Southard D, Iyer S, Schmidbauer G, Sawitzki B, Reinke P, Neuhaus P, Volk HD. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation*. 2002 Sep 15;74(5):591-8.
129. van Uchelen JH, Werker PM, Kon M. Complications of abdominoplasty in 86 patients. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Jun;107(7):1869-73.
130. Vanhoutte PM. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J Clin Invest*. 2001 Jan;107(1):23-5.
131. Veltkamp R, Domoki F, Bari F, Busija DW. Potassium channel activators protect the N-methyl-D-aspartate-induced cerebral vascular dilation after combined hypoxia and ischemia in piglets. *Stroke*. 1998 Apr;29(4):837-42; discussion 842-3.
132. Vicente AM, Guillén MI, Habib A, Alcaraz MJ. Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Dec;307(3):1030-7. Epub 2003 Oct 15.

133. Vitali SH, Mitsialis SA, Liang OD, Liu X, Fernandez-Gonzalez A, Christou H, Wu X, McGowan FX, Kourembanas S. Divergent cardiopulmonary actions of heme oxygenase enzymatic products in chronic hypoxia. *PLoS One*. 2009 Jun 19;4(6):e5978.
134. Wadleigh DJ, Herschman HR. Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene by diverse ligands in murine osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Nov 2;264(3):865-70.
135. Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997 Dec;216(3):456-63.
136. Wagener FA, da Silva JL, Farley T, de Witte T, Kappas A, Abraham NG. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Oct;291(1):416-23.
137. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, Adema G, van Kooyk Y, de Witte T, Figdor CG. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1802-11.
138. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998 Sep 11;281(5383):1680-3.
139. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 22;96(13):7563-8. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Aug 17;96(17):9666.
140. Wilcox CS. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hypertens Rep*. 2002 Apr;4(2):160-6.
141. Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med*. 1996 Jan;2(1):87-90.
142. Wongmekiat O, Thamprasert K, Lumlertgul D. Renoprotective effect of trolox against ischaemia-reperfusion injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Aug;34(8):753-9.
143. Yan CY, Ferrari G, Greene LA. N-acetylcysteine-promoted survival of PC12 cells is glutathione-independent but transcription-dependent. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):26827-32.
144. Yang S, Hu S, Chen J, Choudhry MA, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Mechanism of hepatoprotection in proestrus female rats following trauma-hemorrhage: heme oxygenase-1-derived normalization of hepatic inflammatory responses. *J Leukoc Biol*. 2009 Jun;85(6):1015-26. Epub 2009 Feb 24.
145. Zeng S, Lin Y, Di JF, Feng Z. Protective effect of N-acetylcysteine on liver and lung in mice after ischemia-reperfusion injury. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2009 Nov;25(11):1058-60.
146. Zicha J, Dobesová Z, Kunes J. Antihypertensive mechanisms of chronic captopril or N-acetylcysteine treatment in L-NAME hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2006 Dec;29(12):1021-7.
147. Zuckerman SL, Mirro R, Armstead WM, Shibata M, Leffler CW. Indomethacin reduces ischemia-induced alteration of blood-brain barrier transport in piglets. *Am J Physiol*. 1994 Jun;266(6 Pt 2):H2198-203.



### 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Menger**, dem Leiter des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut und unter seiner Leitung durchzuführen. Seine wissenschaftliche Begeisterung und die vielen konstruktiven Diskussionen haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich **Herrn PD Dr. Yves Harder** für die immerwährende Geduld bei dem Erlernen der experimentellen Techniken sowie bei der Diskussion und Interpretation der Ergebnisse. Durch seine intensive Betreuung, seine Hilfsbereitschaft und Motivation auch nach dem arbeitsbedingten Umzug in die Schweiz wurde nicht nur mein wissenschaftliches sondern auch mein chirurgisches Interesse geweckt und gestärkt, wodurch meine Berufswahl entscheidend beeinflusst wurde. Weiterhin möchte ich ihm für die Möglichkeit danken, in der Abteilung für Plastische Chirurgie in Genf mitzuarbeiten und so einen tieferen Einblick in diese Fachdisziplin zu erhalten.

Mein weiterer Dank gilt **Frau Janine Becker, Frau Elisabeth Gluding und Frau Dr. rer. med. Claudia Scheurer** für die ständige Hilfe bei den alltäglichen organisatorischen Fragen, für die Aufbereitung der Histologien, der Hilfe bei der Herstellung der Chemikalien und die Bereitstellung und Pflege der Mäuse.

Ein großer Dank auch an **Herrn Philipp Mörsdorf** für die Unterstützung in den nicht immer nur einfachen Versuchsphasen und die Hilfe v.a. bei computertechnischen Fragen.

Allen oben genannten Menschen und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts einen herzlichen Dank für die freundliche und familiäre Atmosphäre die dazu geführt hat, dass die Arbeit dort auch in schwierigeren Zeiten immer Spaß gemacht hat und ich immer wieder gerne an diesen Ort zurückkehre.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Sarah Kirsch, danken, ohne deren Motivation, Unterstützung und Verständnis sowie ohne deren ständige Fragen nach dem Fortschreiten der Doktorarbeit dieses Projekt sicher auch nicht möglich gewesen wäre.

## 10. Lebenslauf

### Personalien

Name: Bächle, Annick Catherine  
Geburtsdatum: 03.03.1983  
Geburtsort: St. Ingbert  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Konfession: römisch- katholisch  
Eltern: Hans Bächle ( \*16.07.1955)  
Regina Bächle (\*03.08.1955), geb. Dittmar

### Schulische Ausbildung

09/1989- 07/1993 Grundschule, St.Ingbert  
09/1993- 06/2002 Albertus-Magnus-Gymnasium, St.Ingbert  
06/2002 Abitur

### Universitäre Ausbildung

10/2002-11/2008 Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes,  
Homburg/Saar  
08/2004 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

03/2005	Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie an der Universität des Saarlandes
06/2006-06-2007	Hilfswissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Klinisch- Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes
08/2007-07/2008	Praktisches Jahr, Uniklinik des Saarlandes (Homburg/Saar), Universitätskliniken Genf
11/2008	Staatsexamen
Seit 01/2009	Assistenzärztin, Universitätsklinikum des Saarlandes (Homburg/Saar), Klinik für Unfall-, Wiederherstellungs- und Handchirurgie

### Orginalpublikationen

Wettstein R., Mörsdorf P., **Bächle A.**, Amon M., Menger M.D., Harder Y.

Selective Blockade of Endothelin-B-Receptor improves survival of critically perfused musculocutaneous flaps.

Langenbecks Arch Surg, Volume 392: 331-338, Number 3, Mai 2007.

### Zitierfähige Kongressbeiträge

Mörsdorf P., **Bächle A.**, Amon M., Harder Y., Menger M.D.

Endogen produziertes jedoch nicht exogen induziertes Stickstoffmonoxid reduziert durch Verbesserung der nutritiven Durchblutung die Nekrose in kritisch perfundierten muskulokutanen Lappen.

123. Kongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie , Chirurgisches Forum (Berlin 2006). Chir. Forum, Springer Verlag Heidelberg, Band 35: 391-393, 2006.

**A. Bächle** , P. Mörsdorf, M. Amon, Y. Harder, M.D. Menger

Effects of anti-oxidative treatment strategies on microcirculation in randomly perfused experimental flaps.

Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V. (München 2006). J Vasc Res 2006;43: 533-588.

Mörsdorf P., **Bächle A.**, Amon M., Harder Y., Menger M.D.

Selektive Blockade des Endothelin-B-Rezeptors verbessert durch gesteigerte arterioläre Perfusion das Überleben von kritisch durchbluteten muskulokutanen Lappen.

124. Kongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum (München 2007). Chir. Forum, Springer Verlag Heidelberg, Band 36: 363-365, 2007.

**A. Bächle**, P. Mörsdorf, M. Amon, Y. Harder, M. D. Menger

N-Acetylcysteine improves survival of critically perfused random pattern flaps by reduction of inflammation and maintaining nutritive perfusion.

125. Kongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum (Berlin 2008). Chir. Forum, Springer Verlag Heidelberg, Band 37: 287-289, 2008.

Rezaeian F., Wettstein R., Mörsdorf P., **Bächle A.**, Menger M.D., Harder Y

Nitric oxide induced dilatory effect after erythropoietin pretreatment prevents skin from ischaemic necrosis.

12. Chirurgische Forschungstage, September 2008, Freiburg. Langenbecks Arch Surg Volume 393:759-815, Number 5, September 2008.

Mörsdorf P., **Bächle A.**, Amon M., Schramm R., Rezaeian F., Vollmar B., Harder Y., Menger M.D.

Simvastatin vermindert die ischämiebedingte Entzündung und stimuliert die Neovaskularisierung in kritisch durchbluteten Lappen.

126. Kongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie , Chirurgisches Forum (München 2008). Chir. Forum, Springer Verlag Heidelberg, Band 38: 281-283, 2009.

### **Nicht zitierfähige Kongressbeiträge**

**A. Bächle**, P. Mörsdorf, F. Rezaeian, M. Amon, Y. Harder, M. D. Menger

N-Acetylcysteine improves survival of critically perfused flap tissue by maintaining nutritive perfusion and reducing leukocytic inflammation.

12. Chirurgische Forschungstage, September 2008, Freiburg.

Mörsdorf P., **Bächle A.**, Rezaiean F., Vollmer B., Harder Y., Menger M.D

Simvastatin-conditioning of critically perfused tissue reduces necrosis by improving nutritive perfusion and decreasing *inflammation*.

12. Chirurgische Forschungstage, September 2008, Freiburg.

Steffen M.S., **Bächle A.**, Laschke M.W., Amon M., Harder Y., Menger M.D.

Establishment of a new in vivo model for analysis of the microcirculation in burn injuries.

13. Chirurgische Forschungstage, September 2009, München.